

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-278798

(43) 公開日 平成9年(1997)10月28日

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/705			C 0 7 K 14/705	
A 6 1 K 38/00	A A B		C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 H 21/04			C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 16/28			C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21			C 1 2 P 21/02	C
審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 40 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平9-24190

(22) 出願日 平成9年(1997)2月7日

(31) 優先権主張番号 特願平8-21562

(32) 優先日 平8(1996)2月7日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72) 発明者 日沼 州司

茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田
春日ハイツ1402号

(72) 発明者 坂本 潤一

大阪府豊中市上新田1丁目14番地の30 フ
レグランズA103号室

(72) 発明者 細谷 昌樹

茨城県土浦市板谷1丁目711番地の83

(74) 代理人 弁理士 朝日奈 忠夫 (外1名)

(54) 【発明の名称】 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その製造法および用途

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その製造法および用途の提供。

【解決手段】 ヒト扁桃核由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチド、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、リガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法またはスクリーニング用キット、該スクリーニング方法またはスクリーニング用キットで得られる化合物またはその塩、該化合物またはその塩を含有する医薬、該蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドに対する抗体に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。

【請求項2】請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。

【請求項3】請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または請求項2記載の部分ペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。

【請求項4】配列番号：2で表わされる塩基配列を有する請求項3記載のDNA。

【請求項5】請求項3記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項6】請求項3記載のDNAまたは請求項5記載の組換えベクターを保持する形質転換体。

【請求項7】請求項6記載の形質転換体を培養することを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造方法。

【請求項8】請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項2記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法。

【請求項9】(i) 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項2記載の部分ペプチドもしくはその塩、およびリガンドを接触させた場合と(ii) 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項2記載の部分ペプチドもしくはその塩、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項10】請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項2記載の部分ペプチドもしくはその塩を含有することを特徴とする、リガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項11】請求項9記載のスクリーニング方法または請求項10記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩。

【請求項12】請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項2記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒト扁桃核由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するDNA、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法および該蛋白質およびDNAの用途等に関する。

【0002】

【従来の技術】多くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質は細胞表面あるいは細胞内に存在するレセプター蛋白質を通じて生体の機能調節を行っている。それらの生理活性物質（以下、レセプターに対してリガンドと称する場合がある）とレセプター蛋白質の作用は極めて特異的であり、それによって個々の生理活性物質の標的細胞・臓器、薬理作用、作用強度、作用時間等を決定している。そのため、レセプター蛋白質に作用する物質を探索することは、医薬品を開発するための重要な手段の一つとなっている。特に、新規なレセプター蛋白質に作用する物質を発見することができたならば、その薬理作用は極めてユニークであることが期待できる。種々のレセプター蛋白質のなかで、guanine nucleotide-binding protein（以下、G蛋白質と略称する場合がある）の活性化を介して細胞内へのシグナル伝達を行う一群の蛋白質があり、G蛋白質共役型レセプター蛋白質と呼ばれている。それらの構造上の特徴として、細胞膜を貫通していると考えられている疎水性の高い領域（膜貫通領域）を7個有し、アミノ酸配列においてもお互いに非常に高い類似性を示す。そのため、結合する物質が不明であっても、構造上からレセプター蛋白質であることが推定される。そのため、G蛋白質共役型レセプター蛋白質間の配列の類似性を利用したポリメラーゼ・チェーン・リアクション（Polymerase Chain Reaction：以下、PCRと略称する）、あるいは既知のレセプターcDNAとのハイブリダイゼーション、cDNAのランダムシーケンシング等によって多くの新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAが単離された。一般に、構造の良く似た受容体は、同じく構造の似たリガンドと結合する傾向にある。そのような点から、一部の新規レセプター蛋白質については、結合するリガンドもこれまでに決定されてきた。しかし、構造上の類似性から、明らかに既知のリガンドに類似の構造を有するリガンドと結合することが予想されるにもかかわらず、そのような物質が知られていないものもある。また、リガンドを推定するには不十分な程度の類似性しか示さないレセプターも多く存在し、これらは一括してオーファンレセプターという一つの範疇に分類されている。結合するリガンドは不明であるが、in situ hybridization やノザンブロットティングによって、これらのオーファンレセプターの発現パターンあるいは局在を知ることができる。そのようにして関与する生理機能がある程度推定されている一部のオーファン受容体については、それゆえに一層、

結合するリガンドの決定が望まれている。

【0003】そのようなオーファンレセプターの一つである glucocorticoid induced receptor (GIR) はグルココルチコイドとホルモコリンで処理したマウスのTリンパ球系の細胞株WEHI-7TGより単離された(Harrigan, M. T. et al, Molecular Endocrinology, 5, 1331-1338 (1991))。Tリンパ球をグルココルチコイドで処理することによって、該細胞の代謝系の崩壊を引き起こし、細胞死を誘導することがよく知られている。その際に特異的な遺伝子の発現誘導が引き起こされるが、GIRはそのなかの一つであり、免疫系の調節に関与する受容体であると考えられている。したがって、GIRのリガンドを探索することは、新規な免疫調節物質の研究・開発につながる可能性がある。また、本発明者らは最近、ヒト脳の扁桃核由来のcDNAよりこのレセプターをコードするcDNAに極めて類似する新規なcDNA断片をPCR法によって入手した。部分的に解析したアミノ酸配列の一致度から推定するところによると、この受容体はマウスで知られている受容体GIRのヒト型であると考えられる。これまで、GIRのヒト型の構造は全く知られていなかった。近年の知見では、例えばインターロイキン-6のように免疫系と中枢神経系の両方に作用するような因子も知られている。このことから、このオーファンレセプターならびにそのリガンドは、中枢神経系の機能調節においても重要な機能を担っていることが予想される。また、医薬品の開発の点からは、いずれの医薬品の開発においてもヒト型のレセプター蛋白質を入手し、使用することが望ましい。例えば、化合物によっては、動物種によって効果が全く異なり、それがレセプター自体の種差が原因であると考えられる場合が少なくない。したがって、ヒトの医薬品を研究開発するためには、特にヒト型のレセプター遺伝子が必要であった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ヒト扁桃核由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するDNA、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法および該蛋白質およびDNAの用途等を提供するものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者はヒト扁桃核由来のレセプター蛋白質を部分的にコードするcDNAを既に入手し、その部分塩基配列を解析していたが、このcDNAにコードされるレセプター蛋白質のリガンドを決定し、医薬品の開発に供するために、完全長の翻訳領域を有するcDNAを入手する必要がある。例えば、完全長の翻訳枠を持つcDNAを用いれば、該レセプター蛋白質を効率よく製造することかできる。また、適当な手段で発現させた該レセプター蛋白質を用いれば、レ

セプター蛋白質結合実験あるいは細胞内セカンドメッセンジャーの測定等を指標に、生体内あるいは天然・非天然の化合物より該レセプター蛋白質に対するリガンドをスクリーニングすることができる。さらには、リガンドとレセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物のスクリーニングを行うことができる。より具体的には、G蛋白質共役型レセプターに共通の配列をもとに作成したDNAプライマーを用いたPCRによって得られたヒト扁桃核由来のレセプターについて、完全な一次構造を明らかにし、適当な発現系を構築して当該レセプターに対するリガンドを探索するために、当該レセプターの翻訳領域の5'および3'末端の塩基配列の解析をRACE (Rapid Amplification of cDNA End)法によって行い、その完全長の翻訳領域のクローニングをPCR法によって行った。その結果、配列番号：2に示すような配列を有するcDNAを入手し、それにコードされる全アミノ酸配列を決定した(配列番号：1)。特に、図16および図17に示した配列のうち、1番目のMetから91番目のLeuまで、および301番目のPheから翻訳終止コードンまでをコードする部分については、本発明によって初めて明らかになった。また、92番目のValから300番目のLeuをコードする部分については、p63A2の解析によって部分的に配列が解析されていたが、この領域の配列全てを確定するには至らず、本発明によって初めてこの部分の正確な配列が明らかになった。マウス由来の受容体GIRとの全アミノ酸配列の比較を行ったところ、N末端およびC末端部分においては種差によるものと考えられる配列の相違が見られるものの、85.8%と非常に高いアミノ酸の一致がみられた(図19)。明らかにした完全長の翻訳領域の構造から、それにコードされている蛋白質が、7個の疎水性アミノ酸クラスターを有するいわゆるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の範疇に含まれることがより強く示されるようになった(図18)。また、当該レセプターをコードするcDNAはヒト視床下部cDNAライブラリーおよびヒト全脳poly(A)⁺RNAよりPCR法によって増幅されることから、当該レセプターは中枢神経系の比較的広い部分において機能していることがより強く示唆されるようになった。本発明の、完全長の翻訳領域を有するcDNAを用いれば、受容体蛋白質を製造することができる。また、適当な手段で発現させた該受容体蛋白質を用いれば、受容体蛋白質結合実験あるいは細胞内セカンドメッセンジャーの測定等を指標に、生体内あるいは天然・非天然の化合物より該受容体蛋白質に対するリガンドをスクリーニングすることができる。さらには、リガンドと受容体蛋白質との結合性を变化させる化合物(例えば結合を阻害する化合物)のスクリーニングを行うことがで

【0006】すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一も

しくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

(2) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩(例えば、少なくとも16個のアミノ酸からなる部分ペプチド)、

(3) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、または第(2)項記載の部分ペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

(4) 配列番号: 2で表わされる塩基配列を有する第(3)項記載のDNA、

(5) 第(3)項記載のDNAを含有する組換えベクター、

(6) 第(3)項記載のDNAまたは第(5)項記載のベクターを保持する形質転換体、

(7) 第(6)項記載の形質転換体を培養することを特徴とする第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造方法、

(8) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

(9) (i) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩、およびリガンドを接触させた場合と(ii) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする、リガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニングする方法、

(10) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩を含有することを特徴とする、リガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(11) 第(9)項記載のスクリーニング方法または第(10)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと配列番号: 1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩、および

(12) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体を提供する。

【0007】より具体的には、

(13) リガンドがアンジオテンシン、ボンベニン、カ

ナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP(バソアクティブ・インテスティナル・アンチ・リレイテッド・ペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP(カルシトニンジーンリレイテッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタノイド、トロンボキサン、アデニン、アドレナリン、 α および β -chemokine(IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP1 β 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテログアストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティノクポリペプチドまたはガラニンである第(8)項記載のリガンドの決定方法、

(14) 標識したリガンドを第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、リガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(15) 標識したリガンドを第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、リガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0008】(16) 標識したリガンドを第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜面分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜面分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜面分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、リガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(17) 標識したリガンドを第(6)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現

したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(6)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、リガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0009】(18)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物および試験化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする、リガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(19)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物を第(3)項記載のDNAを含有する形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物および試験化合物を第(3)項記載のDNAを含有する形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする、リガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0010】(20)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物が、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP(バソアクティブインテスティナルアンドリレイテッドペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP(カルシトニンジーンリレイテッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタノイド、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -chemokine(IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF-4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC1-1、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテロカストリン、ヒスタミ

ン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンである第(18)項または第(19)項記載のスクリーニング方法、

(21)第(9)項、第(14)項から第(20)項記載のスクリーニング方法で得られる化合物またはその塩、

(22)第(21)項記載の化合物またはその塩を含有する医薬、

10 (23)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を含有する第(10)項記載のスクリーニング用キット、

(24)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜面分を含有する第(10)項記載のスクリーニング用キット、

(25)第(10)項、第(23)項または第(24)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩、

(26)第(25)項記載の化合物またはその塩を含有する医薬、および

20 (27)第(12)項記載の抗体と、第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩とを接触させることを特徴とする、第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩の測定方法を提供する。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、ヒトまたは温血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)のあらゆる組織(例えば、扁桃腺、下垂体、膵臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、肺、消化管、血管、心臓、胸腺、脾臓、白血球など)または細胞などに由来するG蛋白質共役型レセプター蛋白質であって、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するものであれば如何なるものであってもよい。すなわち、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、配列番号:1で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質などの他に
30 配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と約90%以上、好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、少なくとも1つの生物学的活性において、配列番号:1で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが挙げられる。実質的に同質の活性の具体例としては、例えばリガンド結合活性、シグナル情報伝達などが挙げられる。実質的に同質とは、リガンド結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性の強さなどの強弱、レセプター蛋白質の分子量などの量的要素は異
50 なっていてもよい。より具体的には、本発明のG蛋白質

共役型レセプター蛋白質としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するヒト扁桃核由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質などが挙げられる。また、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、より好ましくは1個以上10個以下、さらに好ましくは数個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、より好ましくは1個以上10個以下、さらに好ましくは数個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、より好ましくは1個以上10個以下、さらに好ましくは数個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を有する蛋白質およびそれらの結合体（例えば、細胞膜貫通領域が欠失している蛋白質）などのムテインも挙げられる。さらに、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質には、N末端のMetが保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC_αアシル基など）で保護されているもの、G1uのN端側が生体内で切断され、該G1uがピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

【0012】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の塩としては、生理学的に許容される塩基（例、アルカリ金属等）や酸（有機酸、無機酸）との塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩は、温血動物の組織または細胞から自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば、以下の部分ペプチドを挙げることができる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位、具体的には、

〔図17〕で示される本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分に相当するペプチドであり、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において1番目のMetから91番目のLeuなどが挙げられる。また、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において92番目のValから300番目のLeu、あるいは

は301番目のPheから423番目のSerのように、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含む部分に相当するペプチドも同様に用いることができる。さらに、個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分ペプチドでもよい。一つの態様において、配列番号：1で表されるアミノ酸配列のうち、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を除いたアミノ酸配列を有する部分ペプチドまたはその部分ペプチドを使用し得る。塩基配列において、配列番号：5（配列番号：2の第274番目から第483番目の塩基配列）で表されるcDNAあるいはその断片は除かれていてもよい。また、別の態様として、好ましくは配列番号：4で表されるアミノ酸残基（配列番号：1の第230番目から第300番目のアミノ酸配列）からの部分ペプチドであって、16個のアミノ酸残基よりも少ないペプチドは本発明の部分ペプチドから除かれてもよい。同様に塩基配列において、配列番号：6（配列番号：2の第688番目から第900番目の塩基配列）で表されるcDNAの中で48個の塩基配列よりも少ないcDNA断片は除かれてもよい。さらに別の態様において、該部分ペプチドは、対応のマウス型蛋白質と比較した場合に（図19）、ヒト型蛋白質に特有のアミノ酸残基を有しているのが好ましい。また、該部分ペプチドは、少なくとも16個のアミノ酸残基、好ましくは少なくとも20個のアミノ酸残基、より好ましくは少なくとも25個のアミノ酸残基を有している。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドの塩としては、上記したG蛋白質共役型レセプター蛋白質の塩と同様のものが用いられる。

【0013】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分を縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の～に記載された方法が挙げられる。

M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publisher s, New York (1966年)

SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

泉尾信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店(1991年)

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のタンパク質を精製分離することができる。上記方法で得られる蛋白質が遊離体である場合は、公知の方法によって適用な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0014】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、本発明の配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ヒトゲノムDNA、ヒトゲノムDNAライブラリー、ヒト組織・細胞由来のcDNA、ヒト組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいづれであってもよい。また、組織・細胞よりRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する。)によって増幅することもできる。より具体的には、配列番号：1のアミノ酸配列を有するヒト扁桃核由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：2で表される塩基配列を有するDNAおよびその部分配列(たとえば、配列番号：2で表される塩基配列における第1～273番目、第274～900番目、第901～1269番目に相当する配列)を有するDNAなどが用いられる。また、上記した部分ペプチド(例えば、少なくとも16個のアミノ酸残基からなる部分ペプチド、ムテイン、個々のドメインを個別に含むペプチドまたは複数のドメインを同時に含むペプチド)をコードするDNAも用いられる。また、該DNAとハイブリッドするDNAも用いられるが、該ハイブリッドDNAは、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質と同一活性を有する蛋白質をコードするDNAである。

【0015】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAをヒトG蛋白質共役型レセプター蛋白質の一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別する。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば Molecular Cloning 2nd (ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに

従って行われる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行う。クローニングされたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルスなどの動物ウイルス、ワクシニアウイルス、アピポックスウイルスなどのポックスウイルス、ヘルペスウイルス、バキュロウイルスなどが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

【0016】形質転換する際の宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trp プロモーター、lac プロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lpp プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、HIV由来のSRαプロモーターなどがそれぞれ利用できる。なお、発現にエンハンサーの利用も効果的である。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質のN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、アルカリフォスファターゼ・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイテイングファクターα・シグナル配列、インバルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、α-インテグリン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ

れ利用できる。このようにして構築されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。

【0017】宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫、動物細胞などが用いられる。上記エシェリヒア属菌、バチルス属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160 (1968)], JM103 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309 (1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517 (1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459 (1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440 (1954)]などが用いられる。上記バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255 (1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87 (1984)]などが用いられる。

【0018】上記酵母としては、たとえばサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12などが用いられる。昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる [前田ら, ネイチャー (Nature), 315巻, 592 (1985)]。動物細胞としては、たとえばサル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO, マウスL細胞, マウスミエローマ細胞, ヒトFL細胞などが用いられる。上記エシェリヒア属菌を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110 (1972)やジーン (Gene), 17巻, 107 (1982)などに記載の方法に従って行なわれる。バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111 (1979)などに記載の方法に従って行われる。酵母を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929 (1978)に記載の方法に従って行なわれる。

【0019】昆虫細胞を形質転換するには、たとえばバイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55 (1988)などに記載の方法に従って行なわれる。動物細胞を

形質転換するには、たとえばウイルス学 (Virology), 52巻, 456 (1973)に記載の方法に従って行なわれる。このようにして、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

【0020】エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスぺリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえば3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばバークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら, 「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)」や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら, 「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)」] が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0021】宿主が昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整する

のが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)〕、DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)〕、RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association), 199巻, 519(1967)〕、199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)〕などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0022】上記培養物からG蛋白質共役型レセプター蛋白質を分離精製するには、例えば下記の方法により行なうことができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出する際には、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりG蛋白質共役型レセプター蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用い得る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのたんぱく変性剤や、トリトンX-100（登録商標。以下、TMと省略することがある。）などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にG蛋白質共役型レセプター蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈殿法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【0023】かくして得られるG蛋白質共役型レセプター蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することかできる。なお、組換え体が産生するG蛋白質

共役型レセプター蛋白質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼなどが用いられる。かくして生成するG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性は標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質(63A2fu11)の製造法に関し、以下に具体例を示す。

63A2fu11をコードするcDNAの完全長の翻訳枠部分を挿入した動物細胞用発現ベクターの作成後述する実施例2によって入手したプラスミドp63A2fu11を制限酵素SalIで消化し、63A2fu11をコードするcDNAの完全長の翻訳枠部分を取り出す。これと同じくSalI消化後に自己閉環を防止するためにBAP(Bacterial Alkaline Phosphatase)処理を施した動物細胞用発現ベクターpAKKO-111等とライゲーション反応を行う。ライゲーション反応完了後は反応液の一部を用いて大腸菌DH5等を形質転換する。得られた形質転換体のうち、63A2fu11をコードするcDNAがpAKKO-111にあらかじめ組み込んであるSR α などのプロモーターに対して順方向に挿入されているものを制限酵素切断によるマッピングあるいは塩基配列の決定によって選別しそのプラスミドDNAを大量に調製する。

新規G蛋白質共役型レセプター63A2fu11を発現するCHO細胞の作成

上記において作成した発現ベクターのDNAを用い、リン酸カルシウム法あるいはリポソーム法などにもとづき動物細胞への遺伝子導入用のキットを用いて、CHO dhfr 細胞に導入する。もとのCHO dhfr 細胞は核酸を含有しない培地では生育できないが、発現ベクターが導入された細胞は核酸不含の培地でも生育できることを利用して核酸不含の培地に透析した仔ウシ血清を添加した選択培地を用いてcDNAが導入された細胞を選択する。さらに選択培地中で生育することで選別される細胞からpoly(A) RNA画分を調製し、市販のキット等を用いてcDNAを調製した後、例えば実施例2に示したようなプライマーを用いてRT-PCRを行う。RT-PCRによって特異的なバンドが検出されることによって、この細胞における63A2fu11の発現が確認できる。選択した発現CHO細胞を、 α -MEM(核酸不含)培地に透析仔ウシ血清10%と適当な抗生物質とを加えたものの中で、37℃、5%CO₂、95%airの条件で培養することにより63A2fu11レセプター蛋白質がCHO細胞中に製造される。

新規G蛋白質共役型レセプター63A2fu11レセプター蛋白質の調製

63A2f u 1 1レセプターを発現するCHO細胞あるいはヒトおよび動物組織、培養細胞を材料として公知の可溶化法およびクロマトグラフィーの手法を用いて63A2f u 1 1レセプター蛋白質を精製する。この際、63A2f u 1 1レセプターに結合するリガンド、あるいは63A2f u 1 1レセプター蛋白質あるいはその部分ペプチドに対する抗体を使用すれば各種クロマトグラフィー画分に含まれる63A2f u 1 1レセプター蛋白質を効率よく検出することができる。より具体的には、適当な方法にて標識したリガンドと63A2f u 1 1レセプターとを結合させた後、この両者を適当な方法で架橋化し、この標識を目印に63A2f u 1 1レセプター蛋白質の精製を行う。また、抗63A2f u 1 1レセプター抗体を結合させて作成した抗体カラムを作成し、これを用いてイムノアフィニティークロマトグラフィーを行えば、より効率よく63A2f u 1 1レセプター蛋白質を入手することができる。さらにこの抗体を用いればEIAあるいはRIA、ウエスタンブロット法などによって、各種クロマトグラフィー画分中に含まれる63A2f u 1 1レセプター蛋白質を定量的に検出することができ、精製の指標とすることができる。また、63A2f u 1 1レセプター蛋白質に結合しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質および各種情報伝達系の分子との相互作用を残し、例えば63A2f u 1 1レセプターのアゴニストあるいはアンタゴニストをスクリーニングするためには完全に純粋な63A2f u 1 1レセプターでなく、膜画分、可溶化物あるいは部分精製品としてもよい。

【0024】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAおよびG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、抗体および抗血清の入手、組み替え型レセプター蛋白質の発現系の構築、同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマーの作成、遺伝子治療等に用いることができる。特に、本発明の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系によって、ヒトなどの温血動物に特異的なG蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、部分ペプチド、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAおよび抗体の用途について、以下により具体的に説明する。

【0025】(1) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法本発明のG蛋白質共

役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドを探索または決定するための試薬として有用である。すなわち、本発明は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または該部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP（バソアクティブ インテスチナル アンチ リレイテッド ペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーテッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタノイド、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -chemokine（IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、IP309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテロカスリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニンなど）の他に、例えばヒトもしくは温血動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸代謝物遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、細胞外pHの変動などを促進する活性または抑制する活性）を有する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を決定する方法である。

【0026】本発明のリガンド決定方法においては、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または該部分ペプチドと、試験化合物とを接触させた場合の、例えば該G蛋白質共役型レセプター蛋白質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量、細胞刺激活性などを測定

することを特徴とする。より具体的には、本発明は、標識した試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または該部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

標識した試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

標識した試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

【0027】試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸代謝物遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、細胞外pHの変動などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、および

試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸代謝物遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、細胞外pHの変動などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

【0028】本発明のリガンド決定方法の具体的な説明を以下にする。まず、リガンド決定方法に用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量

発現させたG蛋白質共役型レセプター蛋白質が適している。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられるが、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことができる。目的部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるか、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス（nuclear polyhedrosis virus: NPV）のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献〔Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.）, 267巻, 19555～19559頁, 1992年〕に記載の方法に従って行うことができる。

【0029】したがって、本発明のリガンド決定方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したG蛋白質共役型レセプター蛋白質または該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドであってもよいし、該蛋白質を含有する細胞を用いてもよく、また該蛋白質を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。本発明のリガンド決定方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kematic社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈殿を膜画分とする。該膜画

分中には、発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

【0030】該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞や膜面分中のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^6$ 分子であるのか好ましく、 $10^4 \sim 10^5$ 分子であるのか好適である。なお、発現量が多いほど膜面当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドを決定する前記の～の方法を実施するためには、適当なG蛋白質共役型レセプター画分と、標識した試験化合物が必要である。G蛋白質共役型レセプター画分としては、天然型のG蛋白質共役型レセプター画分が、またはそれと同等の活性を有する組換え型G蛋白質共役型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識した試験化合物としては、 $[^3H]$ 、

$[^{125}I]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^3S]$ などで標識した上記の試験化合物などが好適である。

【0031】具体的には、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドの決定方法を行うには、まずG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜面分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸バッファー、トリス塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王・アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSEF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm～500000cpm）の $[^3H]$ 、 $[^{125}I]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^3S]$ などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいは γ カウンターで計測する。全結合（B）からNSBを引いたカウント（B-NSB）が0cpmを越える試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋

白質に対するリガンドとして選択することができる。

【0032】G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドを決定する前記の～の方法を実施するためには、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸代謝物遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、細胞外pHの変動などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸代謝物など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

【0033】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンド決定用キットは、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞、あるいは本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜面分を含有するものである。本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。該キットは好ましくはバイアルに下記の各種成分を含んでいる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質および/またはリガンドは上記アッセイ法に従ったうえ、貯蔵維持期間の延長のため凍結乾燥されていてもよい。

1. リガンド決定用試薬

測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

40 Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。孔径0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^4 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂95%airで2日間培養したもの。

標識試験化合物

市販の $[^3H]$ 、 $[^{125}I]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^3S]$ などで

50 標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1μMに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

非標識試験化合物

標識化合物を同じものを100～1000倍濃い濃度に調製する。

【0034】2. 測定法

12穴組織培養用プレートにて培養したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

標識試験化合物を5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を5μl加えておく。

反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1% SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）

を用いて放射活性を測定する。

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合することができるリガンドとしては、例えば脳、下垂体などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的にはアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP（バソアクティブ・インテスティナル・アンδρο・リレイテッド・ペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パングレアスタチン、プロスタノイド、トロンボキサン、アデノジン、アドレナリン、αおよびβ-chemokine（IL-8、GROα、GROβ、GROγ、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1α、MIP-1β、RANTESなど）、エンドセリン、エンテログアストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パングレアティックポリペプチド、ガラニンなどが挙げられる。

【0035】（2）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤

上記（1）の方法において、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に体するリガンドが明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じて、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAをG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤として使用することができる。例えば、生体内において本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質が減少しているためにリガ

ンドの生理作用が期待できない患者がいる場合に、

（イ）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは（ロ）脳細胞などに本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該脳細胞を該患者に移植することなどによって、該患者の脳細胞におけるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量を増加させ、リガンドの作用を充分に発揮させることができる。したがって、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性な本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤などとして用いることができる。本発明のDNAを上記治療剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクター、ポックスウイルスなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該DNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やマイクロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のDNAを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0036】錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモク油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって医薬を処方することかできる。注射用の水性液としては生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポ

リソルベート80 (TM)、 $\text{HCO}-50$) などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

【0037】また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液などの医薬は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができ。該DNAの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1mgから100mg、好ましくは1.0から50mg、より好ましくは1.0から20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形で通常成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01から30mg程度、好ましくは0.1から20mg程度、より好ましくは0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。上記G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを使用する場合、少なくとも90%、好ましくは95%、より好ましくは98%、さらに好ましくは99%に精製されたものを使用する。該蛋白質の調製は上記DNAの場合と同様の方法に従えばよい。例えば生理食塩水のような水溶液を含む医薬が使用される。該蛋白質は上記DNAと同様の方法、同様の濃度で投与できる。

【0038】（3）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法
本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、または本発明の部分ペプチドまたはその塩は、リガンドに対して結合性を有しているため、これを定量用試薬として用いて生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。本発明の定量法は、例えば競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩と接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下のまたはなどに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

入江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和4

9年発行）

入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）

【0039】（1）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドの結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、または本発明の部分ペプチドもしくはその塩を試薬として用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩をスクリーニングすることができる。ここで、リガンドとの結合性を变化させる化合物としては、リガンドとの結合を阻害する化合物、リガンドとの結合を促進する化合物などを挙げることができる。このような化合物には、G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸代謝物遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、細胞外pHの変動などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる本発明のG蛋白質共役型レセプターアゴニスト）と該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる本発明のG蛋白質共役型レセプターアンタゴニスト）などが含まれる。すなわち、本発明は、（i）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩、およびリガンドを接触させた場合と（ii）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング方法においては、（i）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または本発明の部分ペプチド、およびリガンドを接触させた場合と（ii）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または本発明の部分ペプチド、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合における、例えば該G蛋白質共役型レセプター蛋白質または該部分ペプチドに対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

【0040】より具体的には、本発明は、標識したリガンドを、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本

発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識リガンドの該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

標識リガンドを、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識リガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

標識リガンドを、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識リガンドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0041】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物（例えば、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドなど）を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のG蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物および試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸代謝物遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、細胞外pHの変動などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

本発明のG蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物（例えば、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドなど）を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換

体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、本発明のG蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物および試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸代謝物遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、細胞外pHの変動などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0042】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質が得られる以前は、G蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットやマウスなどのG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後該候補化合物が実際にヒトのG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を变化させるか否かを確認する試験、たとえば結合を阻害するか否かを確認する試験（二次スクリーニング）が必要であった。細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際にスクリーニングすることは困難であった。しかしながら、本発明のヒト由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドとG蛋白質共役型レセプターとの結合性を变化させる化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がG蛋白質共役型レセプターアゴニストかG蛋白質共役型レセプターアンタゴニストかを評価することができる。該G蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをヒトの医薬品として研究開発する場合、スクリーニングされた化合物の効果が、動物種によって異なるため、ヒト型のレセプター蛋白質を用いたスクリーニングを行うことが必須である。アゴニストあるいはアンタゴニスト作用の強力な化合物は、化合物の構造と活性の相関を委細に調べ、化合物のデザインを行うことにより創製されることが多い。このような場合、ヒト型のレセプターを用いることができれば、ヒトの医薬品として最適な化合物のデザインと評価は容易に行うことができる。しかしながら動物由来のレセプターが用いられる場合、ヒトにとって強い活性を有する化合物を得ることは一般的にできない。本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下

にする。まず、本発明のスクリーニング方法に用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質（置換体、欠失体、付加体を含む）、またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、温血動物の臓器の膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたG蛋白質共役型レセプター蛋白質が適している。

【0043】G蛋白質共役型レセプター蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられるが、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことができる。目的部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス

(nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、ヒトレトロウイルス由来のSR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献[Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年]に記載の方法に従って行うことができる。したがって、本発明のスクリーニング方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したG蛋白質共役型レセプター蛋白質または該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドであってもよいし、該蛋白質を含有する細胞を用いてもよく、また該蛋白質を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

【0044】本発明のスクリーニング方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化するのが好ましい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。膜画分としては、細胞を破砕した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破砕方法としては、Potter

—Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) のよる破砕、超音波による破砕、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破砕などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破砕液を低速 (500rpm~3000rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000rpm~30000rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞や膜画分中のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量は、1細胞当たり 10^4 ~ 10^6 分子であるのが好ましく、 10^4 ~ 10^6 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0045】リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプターとの結合性を变化させる化合物をスクリーニングする前記の〜を実施するためには、適当なG蛋白質共役型レセプター画分と、標識したリガンドが必要である。G蛋白質共役型レセプター画分としては、天然型のG蛋白質共役型レセプター画分が、またはそれと同等の活性を有する組換え型G蛋白質共役型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば [3 H]、[125 I]、[14 C]、

[35 S] などで標識されたリガンドなどを利用することができる。具体的には、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物のスクリーニングを行うには、まずG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4~10 (望ましくはpH6~8) のリン酸バッファー、トリス・塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターとの結合性を变化させないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM (花王・アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64 (ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~1.0mlの該レセプター溶液に、一定量 (5000cpm~500000cpm) の標識したリガンドを添

加し、同時に 1.0×10^{-10} Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は 0°C から 50°C 、望ましくは 4°C から 37°C で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント(B₀)からNSBを引いたカウント(B₀-NSB)を100%とした時、特異的結合量(B-NSB)が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することかできる。

【0046】リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物をスクリーニングする前記の~の方法を実施するためには、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸代謝物遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、細胞外pHの変動などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸代謝物など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォールスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した細胞としては、天然型の本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を有する細胞株(例えば、マウスT細胞WEHI-7TGなど)、前述の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質発現細胞株などが望ましい。試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0047】リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩

のスクリーニング用キットは、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞、あるいは本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有するものである。本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

10 測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製)に、0.05%のウシ血清アルブミン(シグマ社製)を加えたもの。孔径 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過滅菌し、 4°C で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

G蛋白質共役型レセプター標品

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、 37°C 、5%CO₂/95%airで2日間培養したもの。

標識リガンド

20 市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S] などで標識したリガンド水溶液の状態のものを 4°C あるいは -20°C にて保存し、用時に測定用緩衝液にて $1 \mu\text{M}$ に希釈する。

リガンド標準液

リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン(シグマ社製)を含むPBSで1mMとなるように溶解し、 -20°C で保存する。

【0048】2. 測定法

30 12穴組織培養用プレートにて培養したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、 $490 \mu\text{l}$ の測定用緩衝液を各穴に加える。

10^{-3} ~ 10^{-10} Mの試験化合物溶液を $5 \mu\text{l}$ 加えた後、標識リガンドを $5 \mu\text{l}$ 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物のかわりに 10^{-10} Mのリガンドを $5 \mu\text{l}$ 加えておく。

反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH+1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA(和光純薬製)と混合する。

液体シンチレーションカウンター(ベックマン社製)を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding(PMB)を次の式〔数1〕で求める。

【数1】

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB: Percent Maximum Binding

B: 検体を加えた時の値

NSB: Non specific Binding (非特異的結合量)

B₀: 最大結合量

50 【0049】本発明のスクリーニング方法またはスクリ

ーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプターとの結合性を变化させる化合物であり、具体的にはG蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩（いわゆるG蛋白質共役型レセプターアゴニスト）、あるいは該刺激活性を有しない化合物（いわゆるG蛋白質共役型レセプターアンタゴニスト）である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であつてもよいし、公知の化合物であつてもよい。該G蛋白質共役型レセプターアゴニストは、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。逆に、G蛋白質共役型レセプターアンタゴニストは、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。上記したG蛋白質共役型レセプターアゴニストあるいはアンタゴニストは、脊髄損傷、アルツハイマー病、喘息、過食症、神経障害、痴呆症、痛み、脳血栓症、脳炎、脳梗塞、脳血管攣縮、脊椎炎、狭心症、神経症、オピエート依存症、オピエート離脱症候群、精神分裂症、恐怖症、脳虚血発作、コカイン依存症、コカイン離脱症候群、不安障害、鬱病、呼吸促進症候群、アルコール離脱症候群、嘔吐、癲癇などの疾病の治療・予防剤として用いることができる。

【0050】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモク油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有す

ることができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたかつて処方することができる。

【0051】注射用の水性液としては生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンブルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや温血哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イマ、サルなど）に対して投与することかできる。該化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1から100mg、好ましくは1.0から50mg、より好ましくは1.0から20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形で通常成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01から30mg程度、好ましくは0.1から20mg程度、より好ましくは0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0052】（5）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体または抗血清の製造

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体（例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）または抗血清は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。例えば、ポリクローナル抗体は、後述の方法

に従って製造することかできる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕上記抗原としてのペプチドもしくは蛋白質は、キャリアー用蛋白と結合される。該キャリアー用蛋白としては、例えば、牛チログロブリン、牛血清アルブミン、牛ガンマグロブリン、ヘモシアニン、フロイントの完全アジュバント（ディフコ社製）などがあげられる。該抗原としての蛋白質とキャリアー用蛋白との結合には、公知の常套手段を用いて実施し得る。結合に用いる試薬としては、例えば、グルタルアルデヒド、水溶性カルボジイミドなどがあげられる。抗原としての蛋白質とキャリアー用蛋白との使用比は、約1対1ないし約1対10が適当であり、反応のpHは、中性付近、特に約6～8前後が良好な結果を与える場合が多い。また、反応に要する時間は、約1～12時間が良い場合が多いが、特に、約2～6時間が適当である。このようにして作成された複合物は、常套手段で約0～18℃前後で水に対して透析し、凍結して保存しても良いし、凍結乾燥して保存しても良い。ポリクローナル抗体を製造するためには、上記のようにして製造した免疫原を温血動物に接種される。上記抗体の製造に用いられる温血動物としては、例えば、哺乳温血動物（例、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ラット、マウス、モルモット、ウシ、ウマ、ブタ）、鳥類（例、ニワトリ、ハト、アヒル、ガチョウ、ウズラ）などが挙げられる。免疫原を、温血動物に接種する方法としては、動物に接種する免疫原は、抗体産生をする有効な量であり、例えば、ウサギに1回1mgを1mlの生理食塩水およびフロイントの完全アジュバントで乳化して、背部ならびに後肢掌皮下に1週間おきに5回接種すると抗体を産生させる場合が多い。このようにして、温血動物中に形成された抗体を採取する方法としては、例えばウサギでは、通常最終接種後7日から12日の間に耳静脈から採取し、遠心分離して血清として得られる。得られた抗血清は、通常、各抗原ペプチドを保持させた担体を用いるアフィニティークロマトグラフィーで吸着した画分を回収することによりポリクローナル抗体を精製することができる。また、モノクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することかできる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩（以下、G蛋白質共役型レセプターと略称する場合がある）は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、たとえばサル、ウサギ、イ

ヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、たとえばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化G蛋白質共役型レセプターと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、たとえばケーラーとミルスタインの方法（ネイチャー（Nature）、256、495（1975））に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

- 【0053】骨髓腫細胞としてはたとえばNS-1、P3U1、SP2-0、AP-1などがあげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80％程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗G蛋白質共役型レセプター抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、たとえばG蛋白質共役型レセプター抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合した抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したG蛋白質共役型レセプターを加え、固相に結合した抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なわれる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20％、好ましくは10～20％の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10％の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM 101、日本製薬（株））などを用いることかできる。培養温度は、通常20～40℃、好ま

し、は約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なわれる。ハイブリドマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗G蛋白質共役型レセプター抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0054】(b)モノクローナル抗体の精製

抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体(例、DEAE)による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行われる。以上の(1)および(2)の方法に従って製造させる本発明のG蛋白質共役型レセプター抗体は、G蛋白質共役型レセプターを特異的に認識することができるので、被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、(i)本発明のG蛋白質共役型レセプターに反応する抗体と、被検液および標識化G蛋白質共役型レセプターとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化G蛋白質共役型レセプターの割合を測定することを特徴とする被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量法、(2)被検液と担体上に不溶化した抗体および標識化された抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量法において、一方の抗体がG蛋白質共役型レセプターのN端部を認識する抗体で、他方の抗体がG蛋白質共役型レセプターのC端部に反応する抗体であることを特徴とする被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量法を提供する。

【0055】本発明のG蛋白質共役型レセプターを認識するモノクローナル抗体(以下、抗G蛋白質共役型レセプター抗体と称する場合がある)を用いてG蛋白質共役型レセプターの測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a b'), F a b', あるいはF a b画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量(例えばG蛋白質共役型レセプター量)に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。標識物質を用いる測

定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが挙げられる。放射性同位元素としては、例えば ^{125}I 、 ^{131}I 、

^3H 、 ^{14}C などか、上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等が、蛍光物質としては、フルオレスカミン、フルオレシセンイソチオシアネートなどか、発光物質としては、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれ挙げられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

【0056】抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。サンドイッチ法においては不溶化した抗G蛋白質共役型レセプター抗体に被検液を反応させ(1次反応)、さらに標識化抗G蛋白質共役型レセプター抗体を反応させ(2次反応)たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中のG蛋白質共役型レセプター量を定量することかできる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。本発明のサンドイッチ法によるG蛋白質共役型レセプターの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる抗G蛋白質共役型レセプター抗体はG蛋白質共役型レセプターの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、G蛋白質共役型レセプターのC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

【0057】本発明のG蛋白質共役型レセプター抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B、F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B、F分離をポリエチレンゲ

リコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0058】これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えてG蛋白質共役型レセプターの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY, Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))」(以上、アカデミックプレス社発行)など参照)。以上のように、本発明のG蛋白質共役型レセプター抗体を用いることによって、G蛋白質共役型レセプターを感度良く定量することができる。本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

【0059】

DNA : デオキシリボ核酸
cDNA : 相補的デオキシリボ核酸

A : アデニン
T : チミン
G : グアニン
C : シトシン
RNA : リボ核酸
mRNA : メッセンジャーリボ核酸
dATP : デオキシアデノシン三リン酸
dTTP : デオキシチミジン三リン酸
dGTP : デオキシグアノシン三リン酸
10 dCTP : デオキシシチジン三リン酸
ATP : アデノシン三リン酸
EDTA : エチレンジアミン四酢酸
SDS : ドデシル硫酸ナトリウム
EIA : エンザイムイムノアッセイ
Gly : グリシン
Ala : アラニン
Val : バリン
Leu : ロイシン
Ile : イソロイシン
20 Ser : セリン
Thr : スレオニン
Cys : システイン
Met : メチオニン

【0060】

Glu : グルタミン酸
Asp : アスパラギン酸
Lys : リジン
Arg : アルギニン
His : ヒスチジン
30 Phe : フェニルアラニン
Tyr : チロシン
Trp : トリプトファン
Pro : プロリン
Asn : アスパラギン
Gln : グルタミン

【0061】本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕p63A2fullに含まれるcDNAにコードされるヒト扁桃核由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の全長アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕p63A2fullに含まれるヒト扁桃核由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNAの全塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕p63A2に含まれるcDNA断片の部分の5'末端側の塩基配列の解析の結果推定されたヒト扁桃核由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：4〕p63A2に含まれるcDNA断片の部分の3'末端側の塩基配列の解析の結果推定されたヒト扁桃核由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ア

ミノ酸配列を示す。

〔配列番号：5〕 p63A2に含まれるヒト扁桃核由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片を5'末端側から解析して得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕 p63A2に含まれるヒト扁桃核由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片を3'末端側から解析して得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA。

〔配列番号：8〕 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA。

〔配列番号：9〕 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA。

〔配列番号：10〕 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA。

〔配列番号：11〕 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA。

〔配列番号：12〕 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA。

〔配列番号：13〕 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA。

〔配列番号：14〕 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA。

〔配列番号：15〕 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA。

〔配列番号：16〕 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA。

〔配列番号：17〕 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA。

〔配列番号：18〕 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA。

〔配列番号：19〕 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA。

【0062】後述の参考例3で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) INV α F' / p63A2は、平成6年8月9日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に受託番号FERM

RM BP-4777として寄託されており、また平成6年8月22日から財団法人発酵研究所 (IFO) に IFO 15738として寄託されている。また、後述の実施例2で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) Escherichia coli / p63A2 fullは、平成8年2月2日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に受託番号FERM BP-5380として寄託されており、また平成8年2月13日から財団法人発酵研究所 (IFO) に IFO 15924として寄託されている。

【0063】

【実施例】以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0064】

【参考例1】G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを増幅させるための合成DNAプライマーの製造

20 公知のヒト由来TRHレセプター蛋白質 (HTRHR)、ヒト由来RANTESレセプター蛋白質 (HUMRANTES)、ヒトパーキンソン腫由来リガンド不明レセプター蛋白質 (HSBLR1A)、ヒト由来ゾマトスタチンレセプター蛋白質 (HUMSOMAT)、ラット由来 μ -オピオイドレセプター蛋白質 (RNU02083)、ラット由来 κ -オピオイドレセプター蛋白質 (U00442)、ヒト由来ニューロメジンBレセプター蛋白質 (HUMNMBR)、ヒト由来ムスカリン作動性アセチルコリンレセプター蛋白質 (HSHM4)、
30 ラット由来アドレナリン α_1 Bレセプター蛋白質 (RATAADRE01)、ヒト由来ゾマトスタチン3レセプター蛋白質 (HUMSSTR3X)、ヒト由来Craレセプター蛋白質 (HUMC5AAR)、ヒト由来リガンド不明レセプター蛋白質 (HUMRDC1A)、ヒト由来リガンド不明レセプター蛋白質 (HUMRDC1A)、ヒト由来リガンド不明レセプター蛋白質 (HUMOPIODRE) およびラット由来アドレナリン α_2 B (RATA2BAR) の第1膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を比較し、類似性の高い部分を見いだした。

40 【0065】また、公知のラット由来リガンド不明レセプター蛋白質 (HUMSGIR)、ヒト由来ボンベジンレセプター蛋白質 (HUMBOMB3S)、ヒト由来アデノシンA2レセプター蛋白質 (S46950)、マウス由来リガンド不明レセプター蛋白質 (MUSGPCR)、マウス由来TRHレセプター蛋白質 (S43387)、ラット由来ニューロメジンKレセプター蛋白質 (RATNEURA)、ラット由来アデノシンA1レセプター蛋白質 (RATA1ARA)、ヒト由来ニューロ
50 キニンAレセプター蛋白質 (HUMNEKAR)、ラッ

ト由来アデノシンA3レセプター蛋白質(RATADENREC)、ヒト由来ゾマトスタチン1レセプター蛋白質(HUMSR1A)、ヒト由来ニューロキニン3レセプター蛋白質(S86371S4)、ラット由来リガンド不明レセプター蛋白質(RNCGPCR)、ヒト由来ゾマトスタチン4レセプター蛋白質(HUMSTR4Z)およびラット由来GnRHレセプター蛋白質(RATGNRHA)の第6膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を比較し、類似性の高い*

[合成DNA]

5'-CGTGG (GまたはC) C (AまたはC) T (GまたはC) (GまたはC) TGGGCAAC (A、G、CまたはT) (CまたはT) CCTG-3'

(配列番号: 7)

5'-GT (A、G、CまたはT) G (AまたはT) (AまたはG) (AまたはG) GGCA (A、G、CまたはT) CCAGCAGA (GまたはT) GGCAAA-3'

(配列番号: 8)

() 内は合成時に複数の塩基に混合して合成する。

【0067】

【参考例2】ヒト扁桃核由来cDNAを用いたPCR反応による受容体cDNAの増幅

ヒト扁桃核由来cDNA (QUICK-Clone, CLONTECH社) を鋳型として用い、参考例1で得られた合成DNAプライマーを用いてPCRによる増幅を行った。反応液の組成は、合成DNAプライマー(配列: 5'プライマー配列および3'プライマー配列)各1μM、鋳型cDNA 1ng、0.25mM dNTPs、Taq DNA polymerase 1μlおよび酵素に付属のバッファー1で、総反応溶液量は100μlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー(パーキン・エルマー社)を用い、95℃・1分、55℃・1分、72℃・1分のサイクルを30回繰り返した。Taq DNA polymerase を添加する前に、残りの反応液を混合し、95℃・5分、65℃・5分の加熱を行った。増幅産物の確認は1.2%アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。

【0068】

【参考例3】PCR産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入cDNA部分の塩基配列の解読による新規レセプター候補クローンの選択

PCR後の反応産物は0.8%の低融点アガロースゲルを用いて分離し、バンドの部分のカミソリで切り出した後、熱融解、フェノール抽出、エタノール沈殿を行ってDNAを回収した。TAクローニングキット(インビトロゲン社)の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCRTMIIへサブクローニングした。これを大腸菌INVαF' competent cell (インビトロゲン社)に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離した。個々のクローンをアンピシ

*部分を見いだした。特に多くの受容体cDNAで一致する塩基部分を基準とし、その他の部分においてもなるだけ多くの受容体cDNAと配列の一致性を高めるために混合塩基の導入を計画した。この配列をもとに、共通する塩基配列に相補的である配列番号: 7または配列番号: 8で表わされる塩基配列を有する合成DNA 2本を作成した。

【0066】

※リンを含むLB培地で一晚培養し、自動プラスミド抽出装置(クラボウ)を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いてEcoRIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。残りのDNAの一部をさらにRNAse処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社)を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。得られた塩基配列の情報は、DNASIS (日立システムエンジニアリング社)を用いて行った。決定した塩基配列[図1および図2]をもとにホモロジー検索を行なった結果、形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) INVαF' / p63A2の保有するプラスミドp63A2に挿入されたcDNA断片が新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードすることが示唆された。それをさらに確認するために、DNASIS (日立システムエンジニアリング社)を用い、塩基配列をアミノ酸配列に変換した後[図1および図2]、疎水性プロット[図3および図4]およびアミノ酸配列に基づくホモロジー検索を行い、マウスGIRとの相同性を見いだした[図5]。配列番号: 3および4で表される部分ペプチドは上記の方法にしたがい得られる。

【0069】

【実施例1】RACE (Rapid Amplification of cDNA End) 法によるヒト視床下部cDNAライブラリーからの新規ヒトオーファン受容体(63A2full)をコードするcDNAの配列未知領域のクローニング RACE法の鋳型としては、ヒト視床下部cDNAライブラリー (CONTECH社)を用意した。このcDNAライブラリーはファージベクターλgt11で構築してあるため、cDNA部分を増幅するためのプライマーとして公知のλgt11のleft arm部分の塩基配列をもとに

U1: 配列 5'-ATATGGGGATTGGTGGCGACGACTC-3'
(25mer) (配列番号: 9)

U2: 配列 5'-CAACATCAGCCGCTACAGTCAACAG-3'
(25mer) (配列番号: 10)

また、right arm部分の塩基配列をもとに

L1: 配列 5'-GCCCCGGTTATTATTATTTTGGACAC-3'
(25mer) (配列番号: 11)

L2: 配列 5'-TTCCTTACGCGAAATACGGGCAGAC-3'
(25mer) (配列番号: 12)

を合成した。また、63A2に特異的なプライマーとし * *て、

63U: 配列 5'-CGGCCACCAGCCTCTTCATCGTCAACC
TGGC-3' (31mer) (配列番号: 13)

63L: 配列 5'-GGCAACCAGCAGAGGGCAAAGAGGACT
ACC-3' (30mer) (配列番号: 14)

を合成した。予想される各プライマーと挿入cDNA断片およびλgt11のアームの位置関係を〔図6〕に示した。

【0070】ヒト視床下部cDNA λgt11ファージライブラリー液は20μlを滅菌蒸留水80μlと混合した後、95℃で10分間加熱して熱変性処理をし、水中で10分間急冷した。PCR反応は、AmpliWax PCR Gem 100 (パーキン・エルマー社)を用いた HotStart 法で行った。下層混液として、10× EX PCR Buffer (酵素に添付) 2μl 2.5mM dNTP溶液 4μl、50μM プライマー溶液各 0.5μl (プライマーの組み合わせは〔図6〕、〔図7〕に対応して、lane 1; 63U~63L、lane 2; U1~63U、lane 3; U1~63L、lane 4; U2~63U、lane 5; U2~63L、lane 6; L1~63U、lane 7; L1~63L、lane 8; L2~63U、lane 9; U2~63L)、滅菌蒸留水 13μlを混合した。上層混液としては、鋳型として上記のように調製したファージ液 2.5μl、10× EX PCR Buffer (酵素に添付) 3μl、TaKaRa EX Taq DNA polymerase (宝酒造) 0.5μl、滅菌蒸留水 24μlを混合した。調製した下層混液に AmpliWax PCR Gem 100を1個添加し、70℃で5分間、水中で5分間処理後、上層混液を加えPCRの反応液を調製した。反応液の入ったチューブをサーマルサイクラー Gene ATAQ Controller (ファルマシア社)にセットした後、95℃で3分間、62℃で2分間、75℃で2分間処理した。さらに、95℃で1分間、62℃で1分間、75℃で2分間のサイクルを30回繰り返した後、75℃で8分間処理した。

【0071】反応が終了した後、反応液の一部(5μl)を用い、SeaKem GTG (FMC社) 1%アガロースゲル電気泳動を行って増幅産物の解析を行った。〔図7〕に示すように、多くの増幅産物が検出されたため、サザンハイブリダイゼーションによって63A2に特異的なPCR産物の検出を行った。サザンハイブリダイゼーションにはNon R I標識の DIG System (BOEHRINGER MANN ※50

※HEIM社)を用いた。プローブは、プラスミドp63A2を鋳型とし、63U~63Lをプライマーとして、PCR DIG Probe Synthesis Kit (BOEHRINGER MANNHEIM社)で調製した。サザントランスファーは、20×SSC、0.4M NaOH溶液を用いてキャピラリー法で行った。フィルターへのDNAの固定化はUVクロスリンカー CL-1000 (UVP社)で行った。ハイブリダイゼーションは、調製した PCR DIG Probe 60ngを含む Express Hyb Hybridization Solution (CLONTECH社)を用いて、68℃で1時間行なった。1回目の洗浄は2×SSC、0.1% SDS溶液を用いて、室温で15分間を2回行なった。2回目の洗浄は0.1×SSC、0.1% SDS溶液を用いて、60℃で15分間を2回行なった。ハイブリダイズしたバンドの検出は、DIG Luminescent Detection Kit (BOEHRINGER MANNHEIM社)を用いて行なった。〔図8〕に示したように、サザンハイブリダイゼーションによって、U1~63U、U2~63Uのプライマーの組み合わせでは約670bp付近に、L1~63L、L2~63Lでは約1200bp付近にプローブとハイブリダイズするDNAのバンドが検出された。そこでハイブリダイズしている部分のDNA断片をそれぞれ回収し、TA cloning kit (Invitrogen社)を用いてプラスミドベクターにサブクローニングし、670bpおよび1200bpのPCR産物を保持するクローンについて、挿入部分の塩基配列の解析を行った。シーケンシング反応は、BcaBEST™ Dideoxy Sequencing Kit (宝酒造)を用いて、R.O.B. DNAプロセッサー (ファルマシア社)で行い、塩基配列の決定は、ALF DNA Sequencer II (ファルマシア社)を用いて行なった。

【0072】得られた塩基配列を63A2のマウス型であるGIRと比較したところ、〔図9〕および〔図10〕のように極めて配列の類似する部分の存在を確認した。しかしながら、〔図10〕に示すように、GIRの構造から推定したところ63A2の翻訳枠の3'側については、翻訳が終了するための終止コドンを含む部分が見られなかったことが明らかになった。〔図11〕に

〔図9〕、〔図10〕に示した配列を元にした63A2の今回明らかになった配列および配列未知領域の模式図を示した。次に、3'-AmpliFINDER RACE Kit (CLONTECH社)を用い、ヒト全脳 poly(A)⁺RNA (CLONTECH社) *

63-6: 配列5'-TTCATCCTGCTCTACATCCTGCCCT
CCTC-3' (30mer) (配列番号: 15)

63-7: 配列5'-GCCCTGCGGCGCAAAAAGAAGAAGAC
CATC-3' (30mer) (配列番号: 16)

63-8: 配列5'-GCTGGTGGTAGTCCTCTTTGCCCTCT
GCTG-3' (30mer) (配列番号: 17)

を合成した。First strand cDNAの合成は、1 μg/μlのヒト全脳 poly(A)⁺RNA 1 μlに対してジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理水 (Kit に添付) 1 l、5 μl、10 μMの NN-1 oligo (dT) CDS Primer (Kit に添付) 1 μlを加え、65℃で10分間、氷中で2分間処理した。この混合液に4 × Reverse transcriptase buffer (Kit に添付) 5 μl、Ultapure dNTP mix (Kit に添付) 5 μlを添加し、52℃で2分間処理し、さらに、25 unit/μlの AMV reverse transcriptase (Kit に添付) を0.5 μl加え、52℃で30分間処理した。次いで、2 unit/μl E. coli RNase H (Kit に添付) を0.5 μl添加し、37℃で20分間、95℃で5分間処理した。このようにして調製したものを First strand cDNA 合成溶液として、-20℃に保存した。

【0073】1回目のPCR (primary PCR) は AmpliWax PCR Gem 100 (パーキン・エルマー社)を用いた Hot Start 法で行った。下層混液として、10 × EX PCR Buffer (酵素に添付) 2 μl、10 mM dNTP 溶液 1 μl、10 μM プライマー溶液各 1 μl (プライマーの組み合わせは、〔図12〕に対応して、lane 1; 63U ~ Anchor Primer (Kit に添付)、lane 2; 63-6 ~ Anchor Primer、lane 3; 63-7 ~ Anchor Primer)、滅菌蒸留水 15 μl混合した。上層混液は、鋳型として先に調製した First strand cDNA 合成溶液 1 μl、10 × EX PCR Buffer (酵素に添付) 3 μl、TaKaRa EX Taq DNA polymerase (宝酒造) 0.5 μl、滅菌蒸留水 25.5 μlを混合した。調製した下層混液に AmpliWax PCR Gem 100を1個添加し、70℃で5分間、氷中で5分間処理後、上層混液を加えPCRの反応液を調製した。反応液の入ったチューブをサーマルサイクラー PJ2000 (パーキン・エルマー社)にセットした後、95℃で3分間、60℃で2分間、75℃で2分間処理した。さらに、95℃で1分間、60℃で1分間、75℃で2分間のサイクルを30回繰り返した後、75℃で8分間処理した。

【0074】2回目のPCR (secondary PCR) も同じく AmpliWax PCR Gem 100 (パーキン・エルマー社)を用いた Hot Start 法で行った。下層混液として、10 × EX PCR Buffer (酵素に添付) 2 μl、10 mM dNTP 溶液 1 μl、10 μM プライマー溶液各 1 μl (※50

*を鋳型として翻訳枠の3'側の部分のクローニングを行った。3'-AmpliFINDER RACE用に、63A2に特異的なプライマーとして、

※プライマーの組み合わせは、〔図12〕に対応して、lane 4; 63-6 ~ Anchor Primer、lane 5; 63-7 ~ Anchor Primer、lane 6; 63-8 ~ Anchor Primer)、滅菌蒸留水 15 μl混合した。上層混液は、鋳型として1回目反応したPCR溶液 1 μl (63-6 ~ Anchor Primer の反応には、1回目の63U ~ Anchor Primer で反応したPCR溶液を、63-7 ~ Anchor Primer の反応には、1回目の63-6 ~ Anchor Primer で反応したPCR溶液を、63-8 ~ Anchor Primer の反応には、1回目の63-7 ~ Anchor Primer で反応したPCR溶液を用いた。)、10 × EX PCR Buffer (酵素に添付) 3 μl、TaKaRa EX Taq DNA polymerase (宝酒造) 0.5 μl、滅菌蒸留水 25.5 μlを混合した。調製した下層混液に AmpliWax PCR Gem 100を1個添加し、70℃で5分間、氷中で5分間処理後、上層混液を加えPCRの反応液を調製した。反応液の入ったチューブをサーマルサイクラー PJ2000 (パーキン・エルマー社)にセットした後、95℃で3分間、60℃で2分間、75℃で2分間処理した。さらに、95℃で1分間、60℃で1分間、75℃で2分間のサイクルを30回繰り返した後、75℃で8分間処理した。

【0075】〔図12〕に示すように、1回目のPCRおよびそれを鋳型として行った2回目のPCRのいずれにおいても複数のバンドが出現したため、上記の方法と同様の方法でサザンハイブリダイゼーションによる解析を行った。その結果、〔図13〕に示すように約3 kbのバンドを検出した。ハイブリダイズしている部分のDNA断片をそれぞれ回収し、TA cloning kit (Invitrogen社)を用いてプラスミドベクター中にサブクローニングし、3 kbのPCR産物を保持するクローンについて、挿入部分の塩基配列の解析を行った。シーケンシング反応は、BcaBEST Dideoxy Sequencing Kit (宝酒造)を用いて、R.O.B. DNA プロセッサー (ファルマシア社)で行い、塩基配列の解析は、ALFDNA Sequencer II (ファルマシア社)を用いて行った。得られた塩基配列を63A2のマウス型であるGIRと比較したところ、〔図14〕のようにGIRの翻訳枠の3'末端側に極めて配列の類似する部分の存在を確認した。

【0076】

【実施例2】63A2 full をコードするcDNAの

完全長の翻訳枠部分のクローニング 実施例1によって
決定した5'および3'非翻訳領域部分の配列をもとに、*

*制限酵素S a l I 切断サイトを付加した一組のプライマ

F 6 3 U (-30) : 配列 5'-GGAGTCGACCAAGGGGAGGGGT
GGCTCCTGCAAA-3' (33mer)

(配列番号: 18)

F 6 3 L (1465) : 配列 5'-CCCGTCGACCCCTCCCACTC
CCTCTTCCCAAC-3' (33mer)

(配列番号: 19)

を合成し、63A2fullの完全長の翻訳枠を増幅する
ためのPCRをヒト全脳 QUICK-Clone cDNA (CLONTEC
H社) を鋳型として行った。PCR反応は AmpliWax PCR
Gem 100 (パーキン・エルマー社) を用いた HotStart
法で行った。下層混液として、10× EX PCR Buffer
(酵素に添付) 2μl、2.5mM dNTP溶液 4μ
l、50μM プライマー溶液各0.5μl (プライマーの
組み合わせは、F63U~F63L)、滅菌蒸留水 1
3μl混合した。上層混液は、鋳型としてヒト全脳 QUIC
K-Clone cDNA を1μl、10× EX PCR Buffer (酵素に
添付) 3μl、TaKaRa EX Taq DNA polymerase (宝酒
造) 0.5μl、滅菌蒸留水25.5μlを混合した。調製
した下層混液に AmpliWax PCR Gem 100を1個添加し、
70℃で5分間、氷中で5分間処理後、上層混液を加え
PCRの反応液を調製した。反応液の入ったチューブを
サーマルサイクラー PJ2000 (パーキン・エルマー社)
にセットした後、95℃で3分間、63℃で2分間、7
5℃で2分間処理した。さらに、95℃で1分間、63
℃で1分間、75℃で2分間のサイクルを30回繰り返
した後、75℃で8分間処理した。反応が終了した後、
反応液の一部(5μl)を用い、SeaKem GTG (FMC社)
1%アガロースゲル電気泳動を行って増幅産物の解析を
行った。〔図15〕に示すように、大きさ1.34kbの
バンドを検出した。このPCR産物を、TA cloningkit
(Invitrogen社) を用いてプラスミドベクター中にサブ
クローニングし、得られた形質転換株について挿入部分
の全塩基配列を決定した。Escherichia c
oli p63A2fullと命名した。〔図16および

※図17〕に63A2fullの翻訳領域全長の塩基配
列およびそれから導き出されたアミノ酸配列を示した。

〔図18〕に示すように、疎水性プロットの結果からも
G蛋白質共役型受容体の特徴である7個の疎水性ドメイ
ンの存在が確認された。さらに、〔図19〕に示すよう
に今回明らかになったヒト全脳由来の63A2full
とマウスGIRのアミノ酸配列を比較したところ、8
5.8%の高い相同性を示した。

【0077】

【発明の効果】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白
質および該蛋白質をコードするDNAは、本発明のG
蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決
定、抗体および抗血清の入手、組換え型レセプター
蛋白質の発現系の構築、同発現系を用いたレセプター
結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリー
ニング、構造的に類似したリガンド・レセプターとの比
較にもとづいたドラッグデザインの実施、遺伝子診断
におけるプローブ、PCRプライマーの作成、遺伝子
治療等に用いることができる。特に、G蛋白質共役型の
レセプターの構造・性質の解明はこれらの系に作用する
ユニークな医薬品の開発につながる。

【0078】

【配列表】

【配列番号: 1】

配列の長さ: 423

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Met	Val	Pro	His	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Pro	Leu	Val	Arg	Ala
1				5				10					15	
Thr	Glu	Pro	His	Glu	Gly	Arg	Ala	Asp	Glu	Gln	Ser	Ala	Glu	Ala
				20				25					30	
Leu	Ala	Val	Pro	Asn	Ala	Ser	His	Phe	Phe	Ser	Trp	Asn	Asn	Tyr
				35				40					45	
Phe	Ser	Asp	Trp	Gln	Asn	Phe	Val	Gly	Arg	Arg	Arg	Tyr	Gly	Ala
				50				55					60	
Ser	Gln	Asn	Pro	Thr	Val	Lys	Ala	Leu	Leu	Ile	Val	Ala	Tyr	Ser
				65				70					75	
Ile	Ile	Val	Phe	Ser	Leu	Phe	Gly	Asn	Val	Leu	Val	Cys	His	Val
				85				90					95	
Phe	Lys	Asn	Gln	Arg	Met	His	Ser	Ala	Thr	Ser	Leu	Phe	Ile	Val

51 100 105 110
 Leu Ala Val Ala Asp Ile Met Ile Thr Leu Leu Asn Thr Pro Phe Thr
 115 120 125
 Leu Val Arg Phe Val Asn Ser Thr Trp Ile Phe Gly Lys Gly Met Cys
 130 135 140
 His Val Ser Arg Phe Ala Gln Tyr Cys Ser Leu His Val Ser Ala Leu
 145 150 155 160
 Thr Leu Thr Ala Ile Ala Val Asp Arg His Gln Val Ile Met His Pro
 165 170 175
 Leu Lys Pro Arg Ile Ser Ile Thr Lys Gly Val Ile Tyr Ile Ala Val
 180 185 190
 Ile Trp Thr Met Ala Thr Phe Phe Ser Leu Pro His Ala Ile Cys Gln
 195 200 205
 Lys Leu Phe Thr Phe Lys Tyr Ser Glu Asp Ile Val Arg Ser Leu Cys
 210 215 220
 Leu Pro Asp Phe Pro Glu Pro Ala Asp Leu Phe Trp Lys Tyr Leu Asp
 225 230 235 240
 Leu Ala Thr Phe Ile Leu Leu Tyr Ile Leu Pro Leu Leu Ile Ile Ser
 245 250 255
 Val Ala Tyr Ala Arg Val Ala Lys Lys Leu Trp Leu Cys Asn Met Ile
 260 265 270
 Gly Asp Val Thr Thr Glu Gln Tyr Phe Ala Leu Arg Arg Lys Lys Lys
 275 280 285
 Lys Thr Ile Lys Met Leu Met Leu Val Val Val Leu Phe Ala Leu Cys
 290 295 300
 Trp Phe Pro Leu Asn Cys Tyr Val Leu Leu Leu Ser Ser Lys Val Ile
 305 310 315 320
 Arg Thr Asn Asn Ala Leu Tyr Phe Ala Phe His Trp Phe Ala Met Ser
 325 330 335
 Ser Thr Cys Tyr Asn Pro Phe Ile Tyr Cys Trp Leu Asn Glu Asn Phe
 340 345 350
 Arg Ile Glu Leu Lys Ala Leu Leu Ser Met Cys Gln Arg Pro Pro Lys
 355 360 365
 Pro Gln Glu Asp Arg Pro Pro Ser Pro Val Pro Ser Phe Arg Val Ala
 370 375 380
 Trp Thr Glu Lys Asn Asp Gly Gln Arg Ala Pro Leu Ala Asn Asn Leu
 385 390 395 400
 Leu Pro Thr Ser Gln Leu Gln Ser Gly Lys Thr Asp Leu Ser Ser Val
 405 410 415
 Glu Pro Ile Val Thr Met Ser
 420

【0079】

【配列番号：2】

配列の長さ：1272

配列の型：核酸

* 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

*

配列

ATGGTCCCTC ACCTCTGTCT GCTCTGTCTC CTCCCCTTGG TGCAGCCAC CGAGCCCCAC 60
 GAGGGCCGGG CCGACGAGCA GAGCGCGGAG GCGGCCCTGG CCGTGCCCAA TGCTCGCAC 120
 TTCTTCTCTT GGAACAACCT CACCTTCTCC GACTGGCAGA ACTTTGTGGG CAGGAGGCGC 180
 TACGGCGCTG AGTCCAGAA CCCCACGGTG AATCCCTGTC TCATTGTGGC TTACTCCTTC 240

53

54

ATCATTGTCT TCTCACTCTT TGGCAACGTC CTGGTCTGTC ATGTCATCTT CAAGAACCAG 300
 CGAATGCACT CGGCCACCAG CCTCTTCATC GTCAACCTGG CAGTTGCCGA CATAATGATC 360
 ACGCTGCTCA ACACCCCTT CACTTTGGTT CGCTTTGTGA ACAGCACATG GATATTTGGG 420
 AAGGGCATGT GCCATGTCAG CCGCTTTGCC CAGTACTGCT CACTGCACGT CTCAGCACTG 480
 ACACTGACAG CCATTGCGGT GGATCGCCAC CAGGTCATCA TGCACCCCTT GAAACCCCGG 540
 ATCTCAATCA CAAAGGGTGT CATCTACATC GCTGTCATCT GGACCATGGC TACGTTCTTT 600
 TCACTCCAC ATGCTATCTG CCAGAAATTA TTTACCTTCA AATACAGTGA GGACATTGTG 660
 CGCTCCCTCT GCCTGCCAGA CTTCCCTGAG CCAGCTGACC TCTTCTGGAA GTACCTGGAC 720
 TTGGCCACCT TCATCCTGCT CTACATCCTG CCCCTCCTCA TCATCTCTGT GGCCTACGCT 780
 CGTGTGGCCA AGAAACTGTG GCTGTGTAAT ATGATTGGCG ATGTGACCAC AGAGCAGTAC 840
 TTTGCCCTGC GGCGCAAAAA GAAGAAGACC ATCAAGATGT TGATGCTGGT GGTAGTCTC 900
 TTTGCCCTCT GCTGGTTCCC CCTCAACTGC TACGTCCTCC TCCTGTCCAG CAAGGTCATC 960
 CGCACCAACA ATGCCCTCTA CTTTGCCCTC CACTGGTTTG CCATGAGCAG CACCTGCTAT 1020
 AACCCCTTCA TATACTGCTG GCTGAACGAG AACTTCAGGA TTGAGCTAAA GGCATTACTG 1080
 AGCATGTGTC AAAGACCTCC CAAGCCTCAG GAGGACAGGC CACCCCTCCC AGTTCCTTCC 1140
 TTCAGGTGG CCTGGACAGA GAAGAATGAT GGCCAGAGGG CTCCCCTTGC CAATAACCTC 1200
 CTGCCACCT CCAACTCCA GTCTGGGAAG ACAGACCTGT CATCTGTGGA ACCCATTGTG 1260
 ACGATGAGTT AG 1272

【0080】

【配列番号：3】

配列の長さ：70

* 配列の型：アミノ酸

20 トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：ペプチド

配列

Val Cys His Val Ile Phe Lys Asn Gln Arg Met His Ser Ala Thr Ser
 1 5 10 15
 Leu Phe Ile Val Asn Leu Ala Val Ala Asp Ile Met Ile Thr Leu Leu
 20 25 30
 Asn Thr Pro Phe Thr Leu Val Arg Phe Val Asn Ser Thr Trp Ile Phe
 35 40 45
 Gly Lys Gly Met Cys His Val Ser Arg Phe Ala Gln Tyr Cys Ser Leu
 50 55 60
 His Val Ser Ala Leu Thr
 65 70

【0081】

【配列番号：4】

配列の長さ：71

※ 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：ペプチド

配列

Glu Pro Ala Asp Leu Phe Trp Lys Asn Leu Asp Leu Pro Thr Phe Ile
 1 5 10 15
 Leu Leu Asn Ile Leu Pro Leu Leu Ile Ile Ser Val Ala Tyr Val Arg
 20 25 30
 Val Thr Lys Lys Leu Trp Leu Cys Asn Met Ile Val Asp Val Thr Thr
 35 40 45
 Glu Gln Tyr Phe Ala Leu Arg Pro Lys Lys Lys Lys Thr Ile Lys Met
 50 55 60
 Leu Met Leu Val Val Val Leu
 65 70

【0082】

【配列番号：5】

配列の長さ：210

配列の型：核酸

★鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

★50 特徴を決定した方法：S

配列

GTCTGTCATG TCATCTTCAA GAACCAGCGA ATGCACTCGG CCACCAGCCT CTTTCATCGTC 60
 AACCTGGCAG TTGCCGACAT AATGATCAGC CTGCTCAACA CCCCTTTCAC TTTGGTTTCGC 120
 TTTGTGAACA GCACATGGAT ATTTGGGAAG GGCATGTGCC ATGTCAGCCG CTTTGCCAG 180
 TACTGCTCAC TGCACGTCTC AGCACTGACA 210

【0083】

【配列番号：6】

配列の長さ：213

配列の型：核酸

* 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

* 特徴を決定した方法：S

配列

GAGCCAGCTG ACCTCTTCTG GAAGAACCTG GACTTGCCCA CCTTCATCCT GCTCAACATC 60
 CTGCCCCTCC TCATCATCTC TGTGGCCTAC GTTCGTGTGA CCAAGAACT GTGGCTGTGT 120
 AATATGATTG TCGATGTGAC CACAGAGCAG TACTTTGCC TGCGGCCAA AAAGAAGAAG 180
 ACCATCAAGA TGTGTATGCT GGTGGTAGTC CTC 213

【0084】

【配列番号：7】

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CGTGGSCMTS STGGGCAACN YCCTG 25

【0085】

【配列番号：8】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTNGWRRGGC ANCCAGCAGA KGG
 CAAA 27

【0086】

【配列番号：9】

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATATGGGGAT TGGTGGCGAC GAC
 TC 25

【0087】

【配列番号：10】

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

※配列

CAACATCAGC CGCTACAGTC AACAG 25

【0088】

【配列番号：11】

配列の長さ：25

20 配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCCCCGGTTAT TATTATTTTT GAC
 AC 25

【0089】

【配列番号：12】

配列の長さ：25

30 配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTCTTACGC GAAATACGGG CAG
 AC 25

【0090】

【配列番号：13】

配列の長さ：31

40 配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CGGCCACCAG CCTCTTCATC GTCAACCTGG C 31

【0091】

【配列番号：14】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

※50 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGCAACCAGC AGAGGGCAAA GAG

GACTACC 30

【0092】

【配列番号：15】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTCATCCTGC TCTACATCCT GCC

CCTCCTC 30

【0093】

【配列番号：16】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCCCTGCGC GCAAAAAGAA GAAGACATC 30

【0094】

【配列番号：17】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCTGGTGGA GTCCTCTTTG CCC

TCTGCTG 30

【0095】

【配列番号：18】

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGAGTCGACC AGGGGAGGGG TGG

CTCCTGC AAA 33

【0096】

【配列番号：19】

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCCGTCGACC CCCTCCCACT CCTCTTCCG AAC 33

【0097】

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒト扁桃核よりPCR増幅によって得た新規レセプター蛋白質cDNAクローンp63A2の5'側より解析した部分塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列を示す。下線部分はPCR増幅に用いた合成プライマーに相当する。

【図2】ヒト扁桃核よりPCR増幅によって得た新規レセプター蛋白質cDNAクローンp63A2の3'側より解析した部分塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列を示す。下線部分はPCR増幅に用いた合成プライマーに相当する。

【図3】図1に示したアミノ酸配列をもとに作成した疎水性プロットを示す。この図から1〜3で示す疎水性ドメインの存在が示唆される。

【図4】図2に示したアミノ酸配列をもとに作成した疎水性プロットを示す。この図から4〜6で示す疎水性ドメインの存在が示唆される。

【図5】p63A2にコードされる新規レセプター蛋白質cDNAの解析によって導き出された部分アミノ酸配列とマウスT細胞由来のグルココルチコイドによって発現誘導されるG蛋白質共役型レセプター蛋白質(P30731)の部分アミノ酸配列を比較した図である。黒塗りの部分は一致しているアミノ酸残基を表わす。

【0098】

【図6】ヒト視床下部より新規レセプター蛋白質cDNAの配列未知の領域をRACE法でクローニングするために作成したp63A2に特異的なプライマーおよびsgt11上のプライマーの位置。

【図7】【図6】に示したプライマーを様々な組み合わせで用いてRACE法を行い、得られた増幅産物を1%アガロースゲルを用いた電気泳動によって解析した結果。

【図8】【図7】の複数の増幅産物に対してp63A2特異的な配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行った結果。この図から矢印で示すようなp63A2特異的な配列を有する増幅産物の存在が示唆された。

【図9】RACE法によりヒト視床下部から取得したcDNAの5'末端領域の塩基配列およびマウスT細胞由来のグルココルチコイドによって発現されるG蛋白質共役型レセプター蛋白質GIR(P30731)とのホモロジーサーチの結果。四角で囲った部分は開始コドンとなり得る配列、楕円で囲った部分は終止コドンとなり得る配列を示す。二重の下線で示した部分は全翻訳領域増幅用プライマー部分の配列を示す。この図よりマウスGIR開始コドンの近傍に相当する部分に、RACE法に

60

* 果、楕円で囲った部分は終止コドンとなり得る配列を示す。二重の下線で示した部分は全翻訳領域増幅用プライマー部分の配列を示す。この図よりマウスGIR開始コドンの近傍にp63A2fullにおいても終止コドンになり得る配列が存在することが示唆された。

【図15】 【図9】の5'非翻訳領域の塩基配列および【図14】の3'非翻訳領域の塩基配列をもとにプライマーを作成し、PCR増幅を行い、得られた63A2fullの完全長の翻訳領域を有する増幅産物。

10 **【 0 1 0 0 】**

【図16および図17】〔図15〕に示したPCR増幅産物のサブクローニングにより得られたp63A2fu11にコードされる受容体蛋白質cDNAの全翻訳領域の塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列。

【図18】〔図16および図17〕に示したアミノ酸配列をもとに作成した疎水性プロットを示す。この図からI～VIIで示すように7個の疎水性ドメインの存在が示唆された。

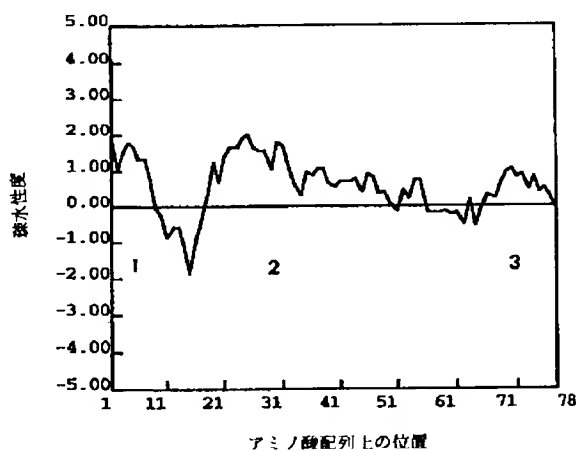
【図19】 p63A2fullにコードされるアミノ酸配列とマウスGIRにコードされるアミノ酸配列を比較した図を示す。黒塗りの部分は一致しているアミノ酸残基を示す。

	10				19				28			37			46			55		
5'	GTG	GGC	ATG	CTG	GGC	AAC	GCC	CTG	GTC	TGT	CAT	GTC	ATC	TTC	AAG	AAC	CAG	CGA		
									Val	Cys	His	Val	Ile	Phe	Lys	Asn	Gln	Arg		
	64				73				82			91			100			109		
	ATG	CAC	TGG	GCC	ACC	AGC	CTC	TTC	ATC	GTC	AAC	CTG	GCA	GTT	GCC	GAC	ATA	ATG		
	Met	His	Ser	Ala	Thr	Ser	Leu	Phe	Ile	Val	Asn	Leu	Ala	Val	Ala	Asp	Ile	Met		
	118				127				136			145			154			163		
	ATC	ACG	CTG	CTC	AAC	ACC	CCC	TTC	ACT	TTG	GTT	CGC	TTT	GTG	AAC	AGC	ACA	TGG		
	Ile	Thr	Leu	Leu	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Leu	Val	Arg	Phe	Val	Asn	Ser	Thr	Trp		
	172				181				190			199			208			217		
	ATA	TTT	GGG	AAG	GGC	ATG	TGC	CAT	GTC	AGC	CGC	TTT	GCC	CAG	TAC	TGC	TCA	CTG		
	Ile	Phe	Gly	Lys	Gly	Met	Cys	His	Val	Ser	Arg	Phe	Ala	Gln	Tyr	Cys	Ser	Leu		
	226				235															
	CAC	GTC	TCA	GCA	CTG	ACA	3'													
	His	Val	Ser	Ala	Leu	Thr														

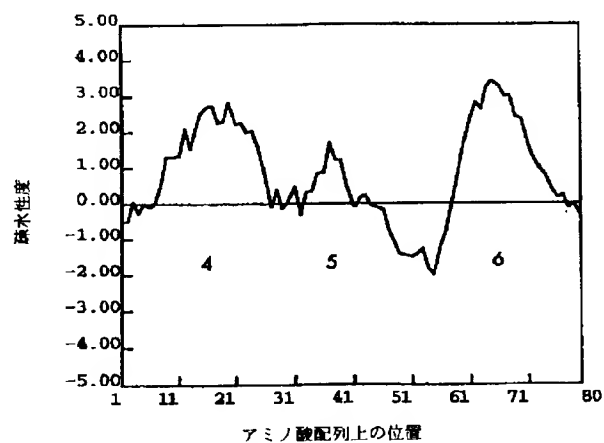
【図2】

5'	GAG	CCA	GCT	GAC	CTC	TTC	TGG	AAG	AAC	CTG	GAC	TTG	CCC	ACC	TTC	ATC	CTG	CTC	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	Glu	Pro	Ala	Asp	Leu	Phe	Trp	Lys	Asn	Leu	Asp	Leu	Pro	Thr	Phe	Ile	Leu	Leu	
	AAC	ATC	CTG	CCC	CTC	CTC	ATC	ATC	TCT	GTG	GCC	TAC	GTT	CGT	GTG	ACC	AAG	AAA	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	Asn	Ile	Leu	Pro	Leu	Leu	Ile	Ile	Ser	Val	Ala	Tyr	Val	Arg	Val	Thr	Lys	Lys	
	CTG	TGG	CTG	TGT	AAT	ATG	ATT	GTC	GAT	GTG	ACC	ACA	GAG	CAG	TAC	TTT	GCC	CTG	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	Leu	Trp	Leu	Cys	Asn	Met	Ile	Val	Asp	Val	Thr	Thr	Glu	Gln	Tyr	Phe	Ala	Leu	
	CGG	CCC	AAA	AAG	AAG	AAG	ACC	ATC	AAG	ATG	TTC	ATG	CTG	GTC	GTA	GTC	CTC	TTT	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	Arg	Pro	Lys	Lys	Lys	Lys	Thr	Ile	Lys	Met	Leu	Met	Leu	Val	Val	Val	Leu	Phe	
	GCC	CTC	TGC	TGG	TTC	CCT	CTC	GAC	3'										
	---	---	---	---	---	---	---	---	---										
	Ala	Leu	Cys	Trp	Leu	Pro	Leu	Asp											

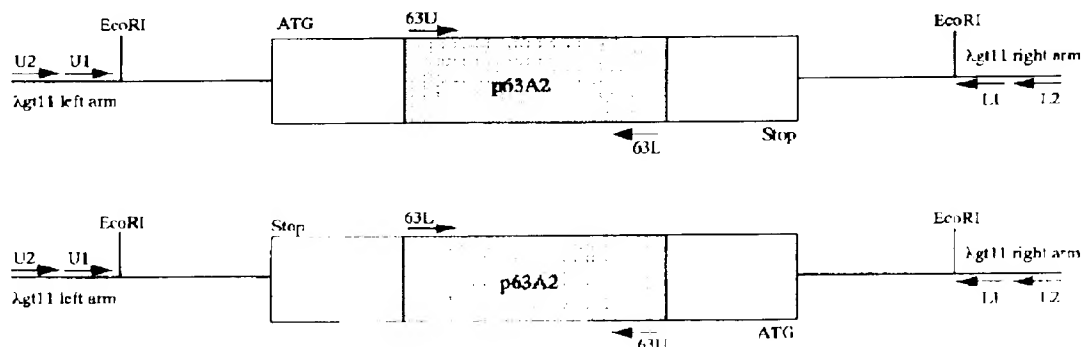
【図3】



【図4】



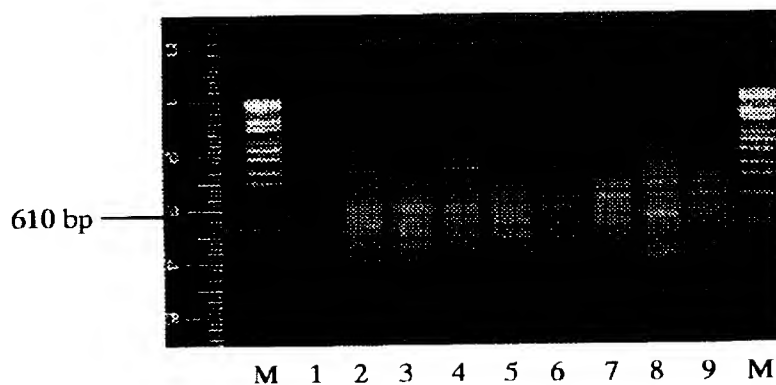
【図6】



【図5】

		10	20	30	40	50	
p63A2	1	VCHVIFKNQR	MHSATSLFIV	NLAVADIMIT	LLNTPFTLVR	FVNSTWIFCK	50
P30731	1	VCHVIFKNQR	MHSATSLFIV	NLAVADIMIT	LLNTPFTLVR	FVNSTWIFCK	50
		60	70	80	90	100	
p63A2	51	GMCHVSRFAQ	YCGLHVSALT				100
P30731	51	GMCHVSRFAQ	YCGLHVSALT	LTAIAVDRHQ	VIMHPLKPRI	SITKGVIYIA	100
		110	120	130	140	150	
p63A2	101				EP	ADLEWNLDL	150
P30731	101	VIWVMATFFS	LPHAICQKLF	TFKYSEDIVR	SLCLPDFPEP	ADLEWYLDL	150
		160	170	180	190	200	
p63A2	151	PIFILLNILE	LLIISVAVVR	VTKKLWLCNM	IVDVTEQYF	ALRPKKKTI	200
P30731	151	ATFILLVYLE	LFIIISVAVAR	VAKKILWLCNT	IGDVTEQYL	ALRPKKKTV	200
		210	220	230	240	250	
p63A2	201	KMLMLVVVL	250
P30731	201	KMLMLVVVL	250

【図7】



M ; λDNA /Sty I マーカー

lane 1 ; 63U~63L

lane 2 ; U1~63U

lane 3 ; U1~63L

lane 4 ; U2~63U

lane 5 ; U2~63L

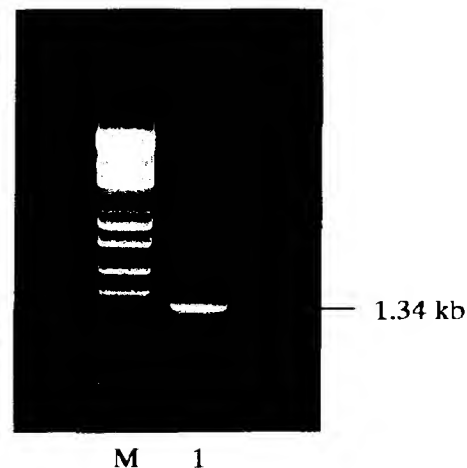
lane 6 ; L1~63U

lane 7 ; L1~63L

lane 8 ; L2~63U

lane 9 ; L2~63L

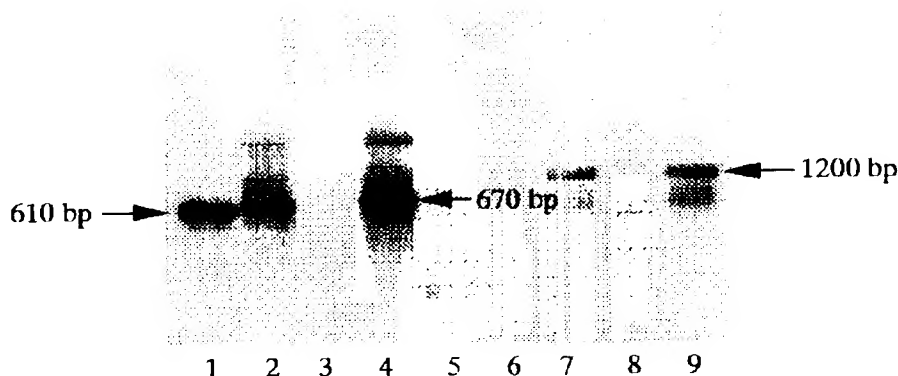
【図15】



M ; λ / StyI

lane 1 ; Whole Brain

【図8】



lane 1 ; 63U~63L
 lane 2 ; U1~63U
 lane 3 ; U1~63L
 lane 4 ; U2~63U
 lane 5 ; U2~63L
 lane 6 ; L1~63U
 lane 7 ; L1~63L
 lane 8 ; L2~63U
 lane 9 ; L2~63L

【図9】

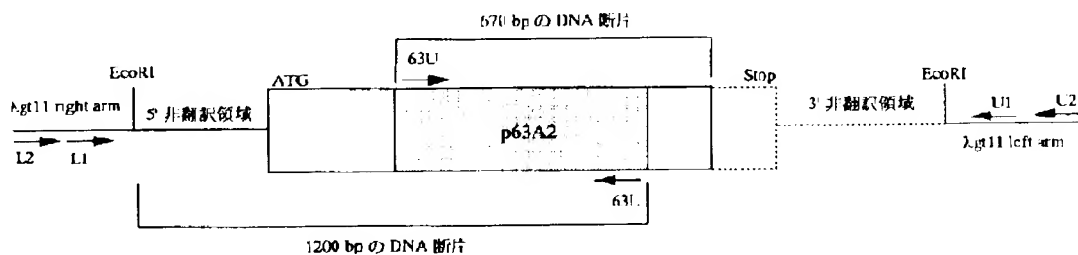
	10	20	30	40	50
63A2-5' . SEQ	GGGCCCCCTTACACCCTTTGTGATTGAGATCCGGGGTTTC-AAGGGGTGCATGATGAAG				
MUSGIR. DNA	GGGCTTCCTCTGTGCCCCGTGCCCTCGCTCCAGGCTCCTCTGTGGTGTGGACTCCTC				
	130	140	150	160	170
63A2-5' . SEQ	GAGTAAGCCACAATAGCAGGGCTTTCACCGTGGGGTCTGGGACTCAGCCCGTAGCCG				
MUSGIR. DNA	TAGCCCGGTGCGCTCAGC--CCCTCGCACC-CAGCCTCCAGGCACAGAGCCCGGCAGGGA				
	190	200	210	220	230
63A2-5' . SEQ	TTCCTGCCACAAAGTTCTCCAGGGGAGGGGTGGCTCCTGCAAAATGCTCCCTCACCTC				
MUSGIR. DNA	GCTCAGCCC-----TTGTGCTAGAGCTGCAGTGGCT-GGACATGAAGTTCTCCTGTC				
	250	260	270	280	290
63A2-5' . SEQ	TTGCTGCTCTGTCTCCTCCCTTGGTGGAGCCACCGAGCCCCACGAGGGCCGGGCCGAC				
MUSGIR. DNA	CTGCTTCTCTTTCTCTGTCTCAGTGCAGCTACTGAGCAACCGCAGGTCCTCACTGAG				
	300	310	320	330	340
63A2-5' . SEQ	GAGCAGAGCGGGAGGCGGCCCTGGCCGTGCCAATGCCTCGCACTTCTTCTTGGAAAC				
MUSGIR. DNA	CATCCCAGCATGGAGGCAGCCCTGACCGGGCCCAACGCCTCCTCGCACTTC---TGGGCC				
	360	370	380	390	400
63A2-5' . SEQ	AACTACACCTTCTCCGACTGGCAGAACTTTGTGGGCAGGAGGTGCTACGGCCTBAGTCC				
MUSGIR. DNA	AACTACACTTTCTCTGACTGGCAGAACTTCGTGGGCAGGAGACGTTATGGGCCCCAGTCC				
	420	430	440	450	460
63A2-5' . SEQ	CAGAACCCACGGTGAAAGCCCTGCTC				
MUSGIR. DNA	CAGAACCCACGGTGAAAGCCCTGCTC				
	480	490	500		

マウス GIR 開始コドン

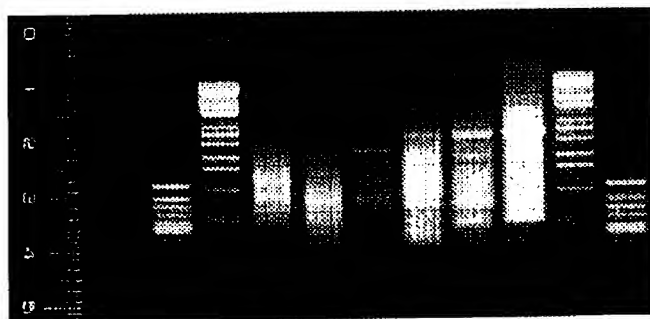
【図10】

	10	20	30	40	50	60
OR16-F. SEQ	TTGCCCTCCYCATCTCTGTGGCTACGCGTGTGGCCAARAACTGTGGCTGTGT					
MUSGIR. DNA	CTTCCACTCTTCATTATCTCAGTGGCTATGCTCGTGTGGCCAAGAAGCTGTGGCTGTGT					
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
	70	80	90	100	110	
OR16-F. SEQ	AATATGATTGGCGATGTGACCACAGAGCAGTACTTTG-CCTKGGCGCAAAAAGAAGAAG					
MUSGIR. DNA	AACACCATTGGCGACGTGACCACAGAGCAGTACCTCGCCCTGCGACGCAAGAAGAAGACC					
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	120	130	140	150	160	170
OR16-F. SEQ	ACCATCAAGATGTTGATGCTGGTGGTAGTCCCTTTGCCCTCCGCTGTTCCCTCAAC					
MUSGIR. DNA	ACCGTGAAGATGCTGGTGGTAGTCCCTTTGCCCTCTGCTGGTTCCTCTCAAC					
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
	180	190	200	210		
OR16-F. SEQ	TGCTACGTCCTCCTCCTGTCCAGCAAGGTCATCCGC					
MUSGIR. DNA	TGCTATGTCCTCCTCTTGTCCAGCAAGGCCATCCAC					
	1210	1220	1230	1240		

【図11】



【図12】



M1 M2 1 2 3 4 5 6 M2 M1

M1 ; ϕ X174 / HincII

M2 ; λ / StyI

lane 1 ; 63U ~ Anchor Primer

lane 2 ; 63-6 ~ Anchor Primer

lane 3 ; 63-7 ~ Anchor Primer

lane 4 ; 63-6 ~ Anchor Primer

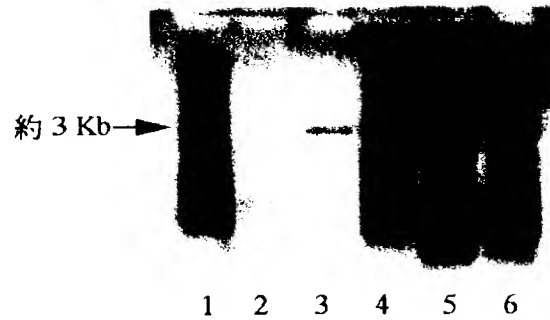
lane 5 ; 63-7 ~ Anchor Primer

lane 6 ; 63-8 ~ Anchor Primer

Primary PCR

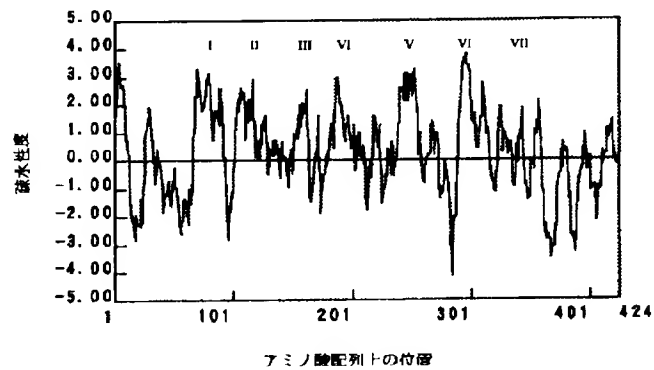
Secondary PCR

【図13】



lane 1 ; 63U~Anchor Primer	Primary PCR
lane 2 ; 63-6~Anchor Primer	
lane 3 ; 63-7~Anchor Primer	
lane 4 ; 63-6~Anchor Primer	Secondary PCR
lane 5 ; 63-7~Anchor Primer	
lane 6 ; 63-8~Anchor Primer	

【図18】



【図 14】

63A2-3'. seq	10	20	30	40	50	60
	CCCTCTGCTGGTTCC	CCCTCAACTGCTAC	GTCCTCCTGTC	CCAGCAAGGTC	ATCCGCA	
MUSGIR. DNA	X	:	:	:	:	:
	CCCTCTGCTGGTTCC	CTCAACTGCTATG	TCCTCCTGTC	CCAGCAAGGCC	ATCCACA	
	1180	1200	1210	1220	1230	1240
63A2-3'. seq	70	80	90	100	110	120
	CCAACAATGCCCTCT	ACTTTGCCTTCC	ACTGGTTTGCC	ATGAGCAGCAC	CTGTATAACC	
MUSGIR. DNA	:	:	:	:	:	:
	CCAACAATGCCCTCT	ACTTTGCCTTCC	ACTGGTTTGCC	ATGAGCAGT	ACTTGTATAACC	
	1250	1260	1270	1280	1290	1300
63A2-3'. seq	130	140	150	160	170	180
	CCTTCATATACTG	CTGGCTGAACG	AGAACTTCAG	GATTGAGCTAA	AGGCATTACT	GAGCA
MUSGIR. DNA	:	:	:	:	:	:
	CCTTCATCTACTG	CTGGCTCAATG	AGAACTTTAG	GGTTGAGCTTA	AGGCATTGCT	GAGCA
	1310	1320	1330	1340	1350	1360
63A2-3'. seq	190	200	210	220	230	240
	TGTGTCAAAGACCT	CCCAAGCCTC	AGGAGGACAG	GCCACCCTCC	CCAGTTCCT	TCCCTTCA
MUSGIR. DNA	:	:	:	:	:	:
	TGTGCCAAAGGCC	ACCAAGCCG	CAGGAAGAC	AGGCTACCCT	CCCAAGTTC	CTTCCCTTCA
	1370	1380	1390	1400	1410	1420
63A2-3'. seq	250	260	270	280	290	300
	GGGTGGCCTGG	ACAGAGAAGA	TATGATGGC	AGAGGGCTCC	CCCTTGCCA	ATAACCTCCTGC
MUSGIR. DNA	:	:	:	:	:	:
	GGGTGGCATGG	ACAGAGAAG	AGCCATGGT	CGGAGGGCT	CCACTACCT	AATCACCACCTTGC
	1430	1440	1450	1460	1470	1480
63A2-3'. seq	310	320	330	340	350	360
	CCACCTCCCACT	CCAGTCTGGG	AAGACAGAC	CTGTCTGTG	GAACCCATT	GTGACGA
MUSGIR. DNA	:	:	:	:	:	:
	CCTCTTCCAGAT	CCAGTCTGGG	AAGACAGAT	CTGTCTGTG	GAACCCGTT	GTGGCCA
	1490	1500	1510	1520	1530	1540
63A2-3'. seq	370	380	390	400	410	
	TGAGTTAGAA	GAGGTTGGG	AAGAGGGAG	TGGGAGGGT	CTGT-CTC-	CAC-CTGAGGCAG
MUSGIR. DNA	:	:	:	:	:	:
	TGAGTTAGGAA	AGCT-GGA	AGTTGGT	GGGGAGGGT	CTTTCTCT	CACAATTGACCAG
マウス GIR 終止コドン	1550	1560	1570	1580	1590	1600
63A2-3'. seq	420	430	440	450	460	470
	GGA--AAGAGAG	-CCTATTCT	CACACATGATC	-TTCAGAGT	GCTGGAAAC	ACACTCCTGC
MUSGIR. DNA	:	:	:	:	:	:
	ACACTAACAGAG	TTGGAAAGT	AACACAGA	AGCAGTGAGA	-TGCTTGGG	TTCTAGGAACC
	1610	1620	1630	1640	1650	1660
63A2-3'. seq	480	490				
	AGAAGCTGTAG	GACTCTTGAAT				
MUSGIR. DNA						
	TGTCCAGCCCC	ATCTGATTTGC				
	1670	1680				

【図16】

5'	ATG	GTC	CCT	CAC	CTC	TTG	CTG	CTC	TGT	CTC	CTC	CCC	TTG	GTG	CGA	GCC	ACC	GAG
	Met	Val	Pro	His	Leu	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Pro	Leu	Val	Arg	Ala	Thr	Glu
	CCC	CAC	GAG	GGC	CGG	GCC	GAC	GAG	CAG	AGC	GCG	GAG	GCG	GCC	CTG	GCC	GTG	CCC
	Pro	His	Glu	Gly	Arg	Ala	Asp	Glu	Gln	Ser	Ala	Glu	Ala	Ala	Leu	Ala	Val	Pro
	AAT	GCC	TCG	CAC	TTC	TTC	TCT	TGG	AAC	AAC	TAC	ACC	TTC	TCC	GAC	TGG	CAG	AAC
	Asn	Ala	Ser	His	Phe	Phe	Ser	Trp	Asn	Asn	Tyr	Thr	Phe	Ser	Asp	Trp	Gln	Asn
	TTT	GTG	GGC	AGG	AGG	CGC	TAC	GGC	GCT	GAG	TCC	CAG	AAC	CCC	ACG	GTG	AAA	GCC
	Phe	Val	Gly	Arg	Arg	Arg	Tyr	Gly	Ala	Glu	Ser	Gln	Asn	Pro	Thr	Val	Lys	Ala
	CTG	CTC	ATT	GTG	GCT	TAC	TCC	TTC	ATC	ATT	GTC	TTC	TCA	CTC	TTT	GGC	AAC	GTG
	Leu	Leu	Ile	Val	Ala	Tyr	Ser	Phe	Ile	Ile	Val	Phe	Ser	Leu	Phe	Gly	Asn	Val
	CTG	GTC	TGT	CAT	GTG	ATC	TTC	AAG	AAC	CAG	CGA	ATG	CAC	TCG	GCC	ACC	AGC	CTC
	Leu	Val	Cys	His	Val	Ile	Phe	Lys	Asn	Gln	Arg	Met	His	Ser	Ala	Thr	Ser	Leu
	TTC	ATC	GTC	AAC	CTG	GCA	GTT	GCC	GAC	ATA	ATG	ATC	ACG	CTG	CTC	AAC	ACC	CCC
	Phe	Ile	Val	Asn	Leu	Ala	Val	Ala	Asp	Ile	Met	Ile	Thr	Leu	Leu	Asn	Thr	Pro
	TTC	ACT	TTG	GTT	CGC	TTT	GTG	AAC	AGC	ACA	TGG	ATA	TTT	GGG	AAG	GGC	ATG	TGC
	Phe	Thr	Leu	Val	Arg	Phe	Val	Asn	Ser	Thr	Trp	Ile	Phe	Gly	Lys	Gly	Met	Cys
	CAT	GTC	AGC	CGC	TTT	GCC	CAG	TAC	TGC	TCA	CTG	CAC	GTC	TCA	GCA	CTG	ACA	CTG
	His	Val	Ser	Arg	Phe	Ala	Gln	Tyr	Cys	Ser	Leu	His	Val	Ser	Ala	Leu	Thr	Leu
	ACA	GCC	ATT	GCG	GTG	GAT	CGC	CAC	CAG	GTC	ATC	ATG	CAC	CCC	TTG	AAA	CCC	CGG
	Thr	Ala	Ile	Ala	Val	Asp	Arg	His	Gln	Val	Ile	Met	His	Pro	Leu	Lys	Pro	Arg
	ATC	TCA	ATC	ACA	AAG	GGT	GTG	ATC	TAC	ATC	GCT	GTC	ATC	TGG	ACC	ATG	GCT	ACG
	Ile	Ser	Ile	Thr	Lys	Gly	Val	Ile	Tyr	Ile	Ala	Val	Ile	Trp	Thr	Met	Ala	Thr
	TTC	TTT	TCA	CTC	CCA	CAT	GCT	ATC	TGC	CAG	AAA	TTA	TTT	ACC	TTC	AAA	TAC	AGT
	Phe	Phe	Ser	Leu	Pro	His	Ala	Ile	Cys	Gln	Lys	Leu	Phe	Thr	Phe	Lys	Tyr	Ser
	GAG	GAC	ATT	GTG	CGC	TCC	CTC	TGC	CTG	CCA	GAC	TTC	CCT	GAG	CCA	GCT	GAC	CTC
	Glu	Asp	Ile	Val	Arg	Ser	Leu	Cys	Leu	Pro	Asp	Phe	Pro	Glu	Pro	Ala	Asp	Leu

【図17】

711	720	729	738	747	756
TTC TGG AAG TAC CTG	GAC TTG GCC ACC	TTC ATC CTG CTC	TAC ATC CTG CCC	CTC	
Phe Trp Lys Tyr	Leu Asp Leu Ala Thr	Phe Ile Leu Leu Tyr	Ile Leu Pro	Leu	
765	774	783	792	801	810
CTC ATC ATC TCT GTG	GCC TAC GCT CGT	GTG GCC AAG AAA	CTG TGG CTG TGT	AAT	
Leu Ile Ile Ser	Val Ala Tyr Ala Arg	Val Ala Lys Lys	Leu Trp Leu Cys	Asn	
819	828	837	846	855	864
ATG ATT GGC GAT GTG	ACC ACA GAG CAG	TAC TTT GCC CTG	CGG CGC AAA AAG	AAG	
Met Ile Gly Asp	Val Thr Thr Glu	Gln Tyr Phe Ala	Leu Arg Arg Lys	Lys Lys	
873	882	891	900	909	918
AAG ACC ATC AAG ATG	TTG ATG CTG GTG	GTA GTC CTC TTT	GCC CTC TGC TGG	TTC	
Lys Thr Ile Lys	Met Leu Met Leu	Val Val Val Leu	Phe Ala Leu Cys	Trp Phe	
927	936	945	954	963	972
CCC CTC AAC TGC TAC	GTC CTC CTC CTG	TCC AGC AAG GTC	ATC CGC ACC AAC	AAT	
Pro Leu Asn Cys	Tyr Val Leu Leu	Leu Ser Ser Lys	Val Ile Arg Thr	Asn Asn	
981	990	999	1008	1017	1026
GCC CTC TAC TTT GCC	TTC CAC TGG TTT	GCC ATG AGC AGC	ACC TGC TAT AAC	CCC	
Ala Leu Tyr Phe	Ala Phe His Trp	Phe Ala Met Ser	Ser Thr Cys Tyr	Asn Pro	
1035	1044	1053	1062	1071	1080
TTC ATA TAC TGC TGG	CTG AAC GAG AAC	TTC AGG ATT GAG	CTA AAG GCA TTA	CTG	
Phe Ile Tyr Cys	Trp Leu Asn Glu	Asn Phe Arg Ile	Glu Leu Lys Ala	Leu Leu	
1089	1098	1107	1116	1125	1134
AGC ATG TGT CAA AGA	CCT CCC AAG CCT	CAG GAG GAC AGG	CCA CCC TCC CCA	GTT	
Ser Met Cys Gln	Arg Pro Pro Lys	Pro Gln Glu Asp	Arg Pro Pro Ser	Pro Val	
1143	1152	1161	1170	1179	1188
CCT TCC TTC AGG GTG	GCC TGG ACA GAG	AAG AAT GAT GGC	CAG AGG GCT CCC	CTT	
Pro Ser Phe Arg	Val Ala Trp Thr	Glu Lys Asn Asp	Gly Gln Arg Ala	Pro Leu	
1197	1206	1215	1224	1233	1242
GCC AAT AAC CTC CTG	CCC ACC TCC CAA	CTC CAG TCT GGG	AAG ACA GAC CTG	TCA	
Ala Asn Asn Leu	Leu Pro Thr Ser	Gln Leu Gln Ser	Gly Lys Thr Asp	Leu Ser	
1251	1260	1269			
TCT GTG GAA CCC ATT	GTG ACG ATG AGT	TAG 3'			
Ser Val Glu Pro	Ile Val Thr Met	Ser ***			

【図19】

63A2. AMI	1	10	20	30	40	50	
MUSGIR. AMI	1	10	20	30	40	50	50
63A2. AMI	51	60	70	80	90	100	100
MUSGIR. AMI	51	60	70	80	90	100	100
63A2. AMI	101	110	120	130	140	150	150
MUSGIR. AMI	101	110	120	130	140	150	150
63A2. AMI	151	160	170	180	190	200	200
MUSGIR. AMI	151	160	170	180	190	200	200
63A2. AMI	201	210	220	230	240	250	250
MUSGIR. AMI	201	210	220	230	240	250	250
63A2. AMI	251	260	270	280	290	300	300
MUSGIR. AMI	251	260	270	280	290	300	300
63A2. AMI	301	310	320	330	340	350	350
MUSGIR. AMI	301	310	320	330	340	350	350
63A2. AMI	351	360	370	380	390	400	400
MUSGIR. AMI	351	360	370	380	390	400	400
63A2. AMI	401	410	420	430	440	450	450
MUSGIR. AMI	401	410	420	430	440	450	450

フロントページの続き

(51) Int. Cl. °	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A		G 0 1 N 33/566	
C 1 2 P 21/02			A 6 1 K 48/00	
G 0 1 N 33/566		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	A
// A 6 1 K 48/00			A 6 1 K 37/02	A A B
C 1 2 Q 1/68		9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:19)				